

Capítulo 3

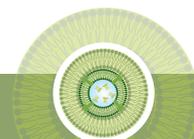
Paso a paso para la caracterización fenotípica y genotípica de bacterias que con frecuencia causan infección intramamaria

J. Vidal¹ MyB, MSc., K. Vargas² MyB, MSc.*

1. Introducción

La determinación de los agentes que afectan la glándula mamaria resulta esencial para seleccionar protocolos de tratamiento, determinar medidas de control en un hato o intervenir cuando se presentan nuevos casos (Adkins & Middleton, 2018). El cultivo microbiológico es considerado como prueba “*gold standard*” para el diagnóstico de agentes causantes de infección intramamaria (El-Sayed et al., 2017); sin embargo,

-
1. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Unidad de Diagnóstico, Universidad de Antioquia, juana.vidal@udea.edu.co
 2. Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis, Universidad de Antioquia, karen.vargas@udea.edu.co



hoy en día se debe hacer junto con el método denominado reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* – PCR; en inglés) (El-Sayed et al., 2017).

Se han descrito como agentes etiológicos de la mastitis bovina más de 150 especies y subespecies bacterianas (Shome et al., 2011). Los patógenos más frecuentes son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y bacterias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia*, así como diferentes especies de *Pseudomonas*, *Proteus* y *Pasteurella* (Reinoso et al., 2008; Vidal et al., 2016). Durante más de 50 años, la clasificación de estos microorganismos fue establecida como causantes de mastitis contagiosa y ambiental. Dicha clasificación se comenzó a modificar por los datos recientes obtenidos a través de herramientas moleculares que contradicen la antigua clasificación (El-Sayed et al., 2017).

El objetivo de este capítulo es ofrecer una guía que ilustra cómo se pueden aislar, identificar y caracterizar de forma fenotípica y genotípica los agentes patógenos causantes de la mastitis bovina.

2. Identificación fenotípica de bacterias patógenas en leche

A continuación se muestra el paso a paso a seguir en el laboratorio para determinar el microorganismo que afecta la glándula mamaria (Figura 1).

* Los resultados de este capítulo son productos de la investigación: Identificación de proteínas inmunogénicas asociadas a formación de biopelículas por cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina. Identificación de proteínas inmunogénicas asociadas a formación de biopelículas por cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina. No. Acta: 2017-15551

nan datos primarios que se usan en estudios epidemiológicos a corto plazo; también sirven para evaluar tendencias epidemiológicas en áreas geográficas definidas o para hacer comparaciones entre diferentes países (Tenover et al., 1997; MacCannell, 2013).

Actualmente, los métodos **genotípicos** son los más usados para estudiar la epidemiología de los microorganismos dada su alta sensibilidad para identificar exactamente el patógeno que se encuentra causando la infección. Así, los métodos genotípicos han contribuido a aumentar la efectividad de los sistemas de vigilancia y mejorar las estrategias de control en salud pública (Clark et al., 2012).

Entre los métodos comúnmente usados para genotipificar bacterias se destaca la prueba PCR. Existen además métodos que sirven para analizar las secuencias de genes específicos en las bacterias, como: PCR de elementos palindrómicos extragenéticos repetitivos (rep-PCR), secuencia de tipo de multilocus (Multilocus sequence typing - MLST), enzimas de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), variantes en un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism - SNP), electroforesis de campo pulsado (Pulsed Field Electrophoresis System - PFEF), multilocus de número variable de repeticiones en tándem (Multiple locus variable number of tandem repeats -MLVA) y la tipificación de *Staphylococcus aureus* con el gen *spa* (Gymrek et al., 2013).

Extracción de ADN para análisis

Las células procariontas están constituidas por una membrana externa compuesta por una bicapa lipídica y un citoplasma que contiene: un cromosoma circular con el material genético o ADN, proteínas, sales inorgánicas, iones metálicos, moléculas de azúcar y otros elementos de la maquinaria celular (Montgomery & Sise, 1990).

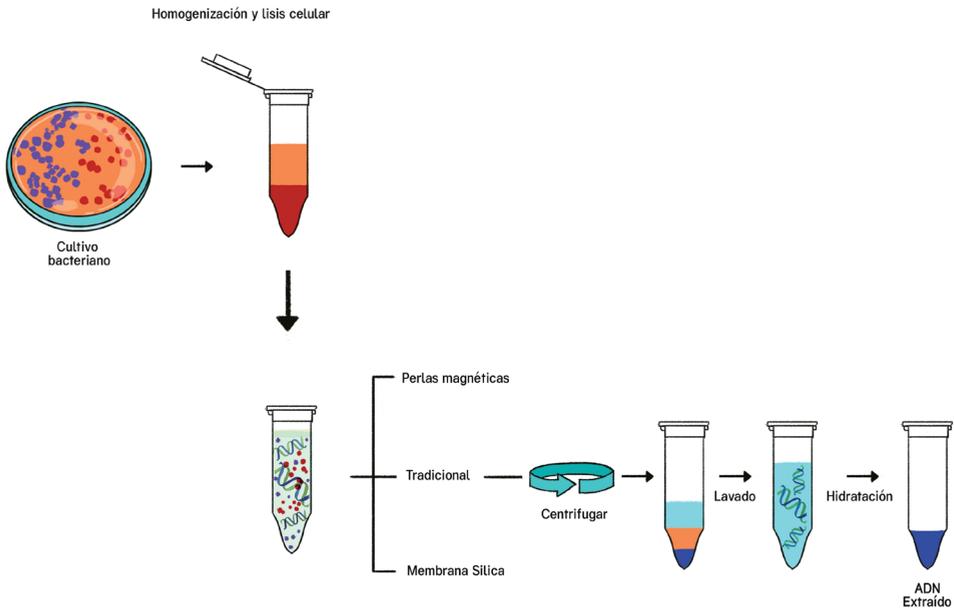


Figura 2. Extracción de ADN.

Fuente: elaboración propia.

La extracción del ADN es el proceso por el cual se separan y recuperan los ácidos nucleicos (citosina, guanina, adenina, timina), descartando las proteínas y otros materiales celulares. El principal objetivo de cualquier técnica de extracción de ADN es eliminar la mayor parte de las sustancias que puedan interferir en las pruebas posteriores o causar que las moléculas de ADN extraídas se descompongan con el tiempo (Löffler et al., 1997).

De forma general, para la extracción de ADN a partir de un cultivo sólido con crecimiento bacteriano se toman de 2 a 3 colonias de bacterias y se transfieren a un vial con 300µl de agua destilada estéril. Posteriormente, se separan los ácidos nucleicos de proteínas y detritos celulares por medio de buffer de lisis, se centrifuga con el fin de separar el ADN (sobrenadan-

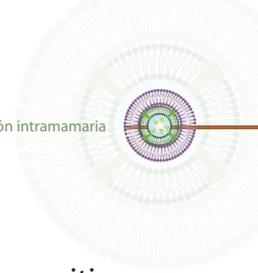
te) de los restos celulares (botón), y dicho sobrenadante se transfiere a un nuevo vial el cual se almacenará a 4 °C hasta el momento de ser utilizado.

2.1.1 PCR

La técnica PCR es utilizada para amplificar *in vitro* genes de importancia presentes en el ADN de los microorganismos. Para ello, se emplean cebadores (*primers*), que son oligonucleótidos específicos para un gen en particular, y que deben contener una secuencia exclusiva que completamente específica y selectivamente a la secuencia diana del ADN del microorganismo. Los cebadores pueden estar diseñados para diferenciar entre microorganismos miembros de la misma especie o para identificarlos a nivel de subespecies. Para realizar el diagnóstico de los patógenos presentes en leche, y evitar resultados falsos negativos, la secuencia diana del cebador debe ser altamente conservada dentro de todas las cepas de la especie bacteriana que se pretende identificar.

Durante la PCR se lleva a cabo un proceso semejante al de la replicación *in vivo* de ADN (ver Figura 3). La PCR está compuesta por fases que incluyen cambios de temperatura que se realizan por medio de un equipo llamado termociclador, instrumento que controla la temperatura y la duración de cada ciclo, lo cual asegura una amplificación eficiente. Este proceso permite que se hagan miles de copias del gen específico a evaluar (ver Figura 3) (Ranjbar et al., 2014).

Las tres fases de la PCR son: desnaturalización, anillamiento y extensión; estas se repiten entre 35 y 40 veces para lograr la amplificación exponencial del gen de interés. La **desnaturalización** consiste en calentar el ADN entre 92 y 98°C para causar la alteración y separación de las hebras, al cortar los enlaces de hidrógeno que unen los nucleótidos.



Una vez estas se separan, se disminuye la temperatura para permitir que los cebadores se emparejen a regiones complementarias del gen de interés; a este paso se le denomina **anillamiento**. La temperatura de anillamiento se encuentra entre 48 y 72°C y está relacionada con la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores, la cual se determina para cada par de cebadores que se use en la PCR. Durante el paso de **extensión** (68-72°C) la polimerasa se extiende por la cadena de ADN molde ingresando nucleótidos para formar una réplica del gen.

En el paso final de la PCR, se mantiene una temperatura única por un tiempo determinado (que puede variar entre 68 y 72°C entre 5 y 10 minutos) para permitir finalizar cualquier copia incompleta y eliminar toda

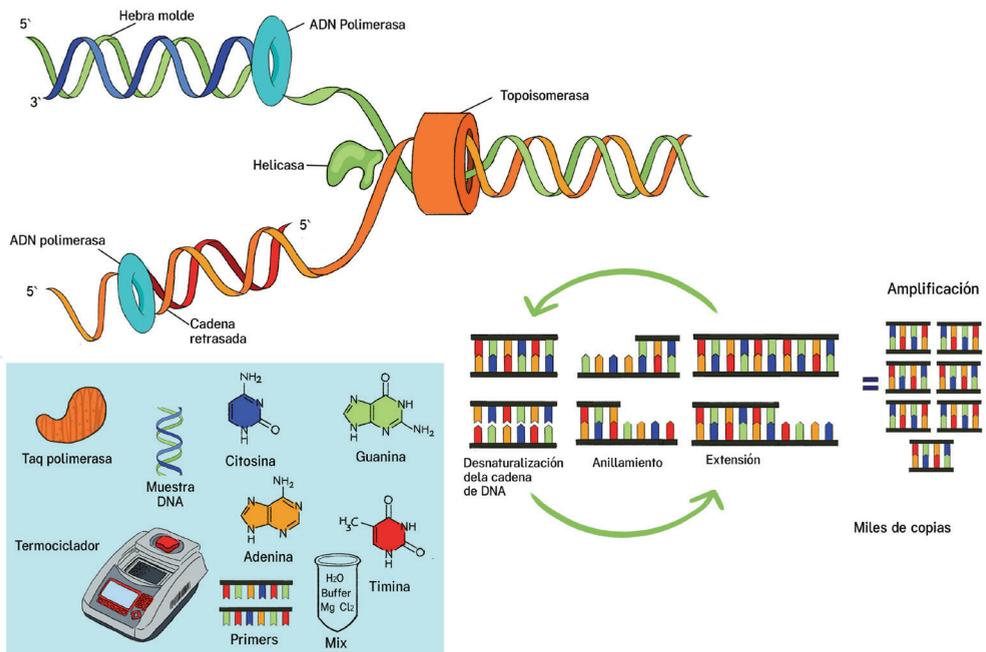
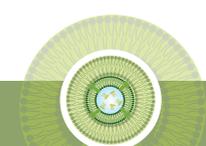


Figura 3. Replicación *in vitro* del ADN por la técnica de PCR.

Fuente: elaboración propia.



la maquinaria de replicación. Una vez completada la PCR, el termociclador se programa a una temperatura entre 4 y -10°C para mantener la integridad del producto hasta el momento en que los tubos se puedan retirar de la máquina (Zhou et al., 2016) (Figura 3).

2.1.2 Rep-PCR

Para el estudio de la diversidad bacteriana se usa la rep-PCR. Los cebadores están diseñados para hallar y amplificar las secuencias repetidas intercaladas de ADN que se encuentran en el genoma (Figura 4) (Bilung et al., 2018). Después de ubicar las secuencias repetitivas en el genoma, el proceso continúa como una PCR tradicional que amplifica estas secuencias.

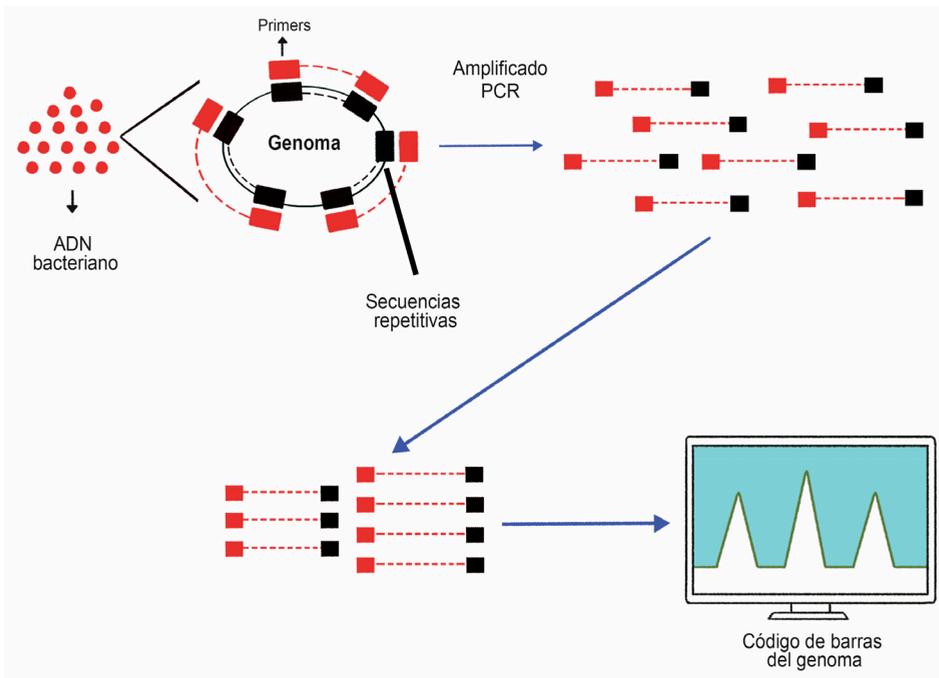
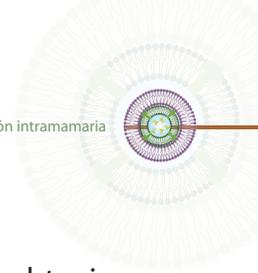


Figura 4. Inserción de *primers* o cebadores en secuencias repetitivas del genoma, rep-PCR.

Fuente: elaboración propia.



En esta metodología se lleva a cabo un análisis de las secuencias obtenidas según el tamaño de sus amplificadas, sus cargas eléctricas, variaciones e intensidad. Con esta información se obtiene un “código de barras” de cada genoma bacteriano.

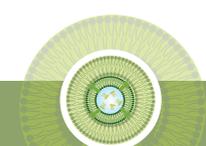
2.1.3 Tipificación de *Staphylococcus aureus* por el gen que codifica proteína estafilocócica A (*spa*)

El gen *spa*, que codifica para la proteína A, es un gen conservado y constitutivo en *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y su tipificación permite relacionar esta bacteria con sus orígenes. Al mismo tiempo, dicho gen posee una región no codificante llamada región polimórfica X (Sabat et al., 2017) que consta de hasta 12 unidades (conjunto de ácidos nucleicos), cada una con organización máxima de 24 pares de bases (ácidos nucleicos). A esta región se le denomina “región número variable de repeticiones en tándem” (*Variable Number of Tandem Repeat* – VNTR) y los resultados de su secuenciación se presentan en letras y números (Figura 5). Esta secuencia es específica de cada cepa de *Staphylococcus aureus*, lo que permite su clasificación (Peacock et al., 2019).

Las secuencias encontradas se asignan a tipos de *spa* particulares utilizando el sitio web de tipificación de *spa* (<http://www.spaserver.ridom.de>). Así, esta técnica es altamente discriminatoria y útil tanto en estudios epidemiológicos locales como globales (Figura 5) (O’Hara et al., 2016).

Ejemplo práctico de genotipificación de cepas de *S. aureus*

El siguiente ejemplo es tomado del trabajo de grado de maestría de Vargas (2019). A cada cepa se le amplificó la región polimórfica del gen que codifica para la proteína A (gen *spa*), conocida como región X, mediante PCR. Los cebadores empleados en la reacción fueron los descritos por



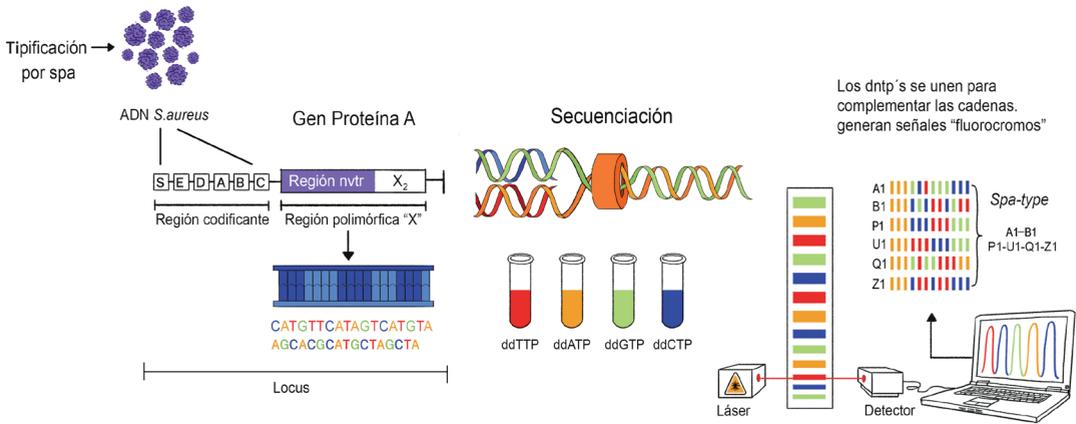


Figura 5. Tipificación de *Staphylococcus aureus* por el gen que codifica la proteína estafilocócica A (*spa*).

Fuente: elaboración propia.

Shopsin y colaboradores (1999), mientras que el perfil térmico seguido fue el reportado por Jiménez y colaboradores (2012): desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 1 minuto y extensión 72 °C por 1 minuto durante 30 ciclos. El tamaño de banda esperado fue de alrededor de 1000 pb, la cual fue posteriormente secuenciada por MacroGen (USA). Los *spa* tipos fueron asignados en dos etapas; en la primera se usó el software eGenomics (Shopsin et al., 1999) y en la segunda se empleó el sitio web Ridom SpaServer (<http://www.spaserver.ridom.de/>) desarrollado por Ridom GmbH. Los CCs fueron inferidos mediante el análisis del patrón de repeticiones de los *spa* tipos obtenidos (Strommenger et al., 2008) o consultando el sitio web de Ridom SpaServer.

La tabla a continuación muestra los resultados obtenidos por municipio evaluado (en Antioquia).

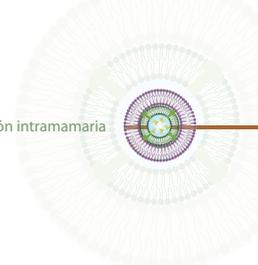
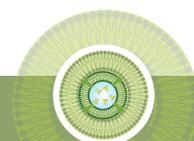


Tabla 1. Resultados obtenidos de la genotipificación de *S. aureus* por medio de la metodología *spa* tipo

Municipio	Complejo Clonal identificado	<i>Spa</i> tipo identificado*	<i>Spa</i> tipo diferentes (%)
San Pedro de los Milagros	CC1, CC479, CC97, CC398, CC8	Nuevos , t605, t543, t527, t2207, t267, t3626, t521, t571, t2112, t8845, t7753, t398, t345, t064	15 (25%)
Santa Rosa de Osos	CC45, CC97, CC8, CC479, CC1, CC98, CC5, CC522, CC084	Nuevos , t521, t543, t267, t2207, t445, t024, t2143, t008, t1106, t1236, t149, t17143, t2112, t2803, t4103, t527, t692	18 (38%)
Belmira	CC479, CC8, CC30, CC1, CC97, CC59, CC98, CC398	Nuevos , t543, t267, t2112, t008, t064, t1135, t2207, t4911, t521, t1236, t5051, t571	13 (38%)
Bello	CC97, CC15, CC479, CC 1, CC5, CC98	t267, t521, t605, t1885, t543, t1107, t1236, t2112, t2207, Nuevos	10 (31%)
Entrerriós	CC97, CC30, CC 1, CC164, CC97, CC479	t267, t521, t1135, t2207, Nuevos , t1429, t2112, t543, t605	10 (44%)
Urrao	CC 1, CC398, CC97, CC037, CC22, CC479	t189, t527, t605, t571, t267, t1190, t515, t521, t543, Nuevos	10 (50%)
Don Matías	CC97, CC1, CC4118	t521, t2207, t527, t1106, t426, Nuevo	6 (35%)
La Unión	CC97, CC8	Nuevo , t521, t2413, t064	4 (44%)
Carolina del Príncipe	CC97, CC479, CC97	t267, t543, t521, Nuevo	4 (50%)
Rionegro	CC1, CC97, CC479	Nuevo , t2207, t267, t543	4 (67%)
Abejorral	CC97, CC5	Nuevo , t267, t458	3 (80%)
San José de la Montaña	CC97, CC1, CC22	t2112, t2207, t521, t515	4 (80%)
La Ceja	CC479, CC4118, CC15	t543, t426, t1885	3 (75%)
Santuario	CC1	Nuevo , t2207, t6280	1 (33%)
San Jerónimo	CC97	t521	2 (99%)

Fuente: Vargas, 2019.

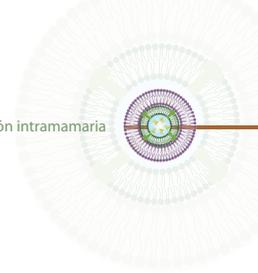


Como se puede ver en la Tabla 1, casi todas las regiones geográficas donde se aisló *S. aureus* presentan clones que no se habían reportado anteriormente, esto indica que las cepas están mutando.

Tabla 2. *Spa* tipos hallados en bovinos afectados con mastitis subclínica y reporte de literatura en donde se encuentra el *spa* tipo reportado en la misma especie u en otras.

Complejo Clonal	<i>Spa</i> tipo (n)	Presencia reporte de <i>Spa</i> tipos
CC 97	t521(12), t267(12)	Presencia en bovinos y humanos, reportado en Mastitis subclínicas en bovinos (Haveri et al., 2008)
CC1/188	t605(8), t527(5), t1190(1), t2207(6), t2207(6)	Presencia en bovinos, conejos (Haveri et al., 2008)
CC479	t543 (9)	Presencia en mastitis clínica y subclínica en bovinos (Boss et al., 2016)
CC8	t008(1), t064(1), t024(1)	Infecciones adquiridas en la comunidad (hospitalarias) humanos, bovinos. (Boss et al., 2016)
CC30	t1135(3)	Principales clones HA y MRSA (Jiménez et al., 2012)
CC45	t2143(1) , t445(2)	Presencia en humanos (Boss et al., 2016)
CC398	t571(2)	Presencia en humanos, asociado a la ganadería (Boss et al., 2016)
CC5	t149(2)	Presencia en humanos (Jiménez et al., 2012)
CC15	t1885(1)	Presencia en humanos (Jiménez et al., 2012)
	t4911 (1)	Presencia en humanos (van Belkum et al., 2009)
	t3626 (1)	Presencia en humanos como cepa MRSA (Van Belkum et al., 2008)
	t515(1)	Presencia en humanos como cepa MRSA (Shore et al., 2011)
Nuevos	(25)	

Fuente: Vargas, 2019.

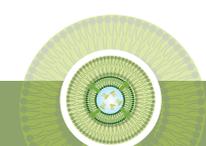


En este estudio se encontró que aproximadamente el 68% de los casos de mastitis analizados fueron causados por cepas de *S. aureus* previamente reportadas como patógenas en humanos (Vargas, 2019). Esta situación requiere atención desde la salud pública, pues en Colombia entre el 43.6% y el 77% del ordeño continúa siendo manual (Ramírez, 2004; Reyes Velez, 2016), lo cual incrementa el riesgo de que los ordeñadores adquieran este patógeno y lo diseminen entre las personas de su entorno. Además, alrededor del 41% de la leche cruda (sin pasteurizar) se comercializa informalmente (Ruiz Cortés et al., 2012), lo que puede facilitar su propagación entre personas que no tengan exposición al ganado (Shepherd et al., 2013).

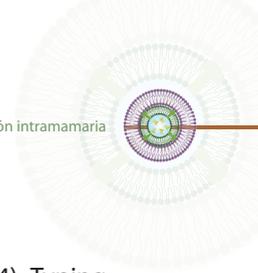
Algunas de las explicaciones a la alta variabilidad genotípica de *S. aureus* (30%) son: la probabilidad de una alta densidad de animales en hatos lecheros bovinos, el ingreso y la salida de animales al hato desde diferentes zonas geográficas, los sistemas de manejo que pueden cambiar entre zonas, la geografía, la temporada del año, la relación entre huéspedes y contacto con el ordeñador. Todos estos factores favorecen la diversidad de la bacteria y facilitan su diseminación en bovinos, humanos y el ambiente (Boss et al., 2016; Kosecka-Strojek et al., 2016).

Bibliografía

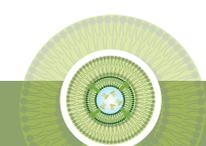
- Adkins, P.R.F. & Middleton, J.R. (2018). Methods for diagnosing mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(3), 479–491.
- Bilung, L.M., Pui, C.F., Su'ut, L. & Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. *Disease Markers*, 2018.
- Boss, R., Cosandey, A., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M. & Michel, A. (2016). Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 515–528.



- Clark, C.G., Taboada, E., Grant, C.C.R., Blakeston, C., Pollari, F., Marshall, B., Rahn, K., MacKinnon, J., Daignault, D. & Pillai, D. (2012). Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 798–809.
- El-Sayed, A., Awad, W., Abdou, N.-E. & Castañeda-Vázquez, H. (2017). Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5(2), 89–97.
- Gymrek, M., McGuire, A.L., Golan, D., Halperin, E. & Erlich, Y. (2013). Identifying personal genomes by surname inference. *Science*, 339(6117), 321–324.
- Haveri, M., Hovinen, M., Roslo, A. & Pyo, S. (2008b). Molecular Types and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Intramammary Infections and Extramammary Sites. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), 3728–3735. doi:10.1128/JCM.00769-08
- Jiménez, J.N., Ocampo, A.M., Vanegas, J.M., Rodriguez, E.A., Mediavilla, J.R., Chen, L., Muskus, C.E., Vélez, L.A., Rojas, C. & Restrepo, A.V. (2012). CC8 MRSA strains harboring SCCmec type IVc are predominant in Colombian hospitals. *PLoS One*, 7(6), e38576.
- Kosecka-Strojek, M., Ilcyszyn, W.M., Buda, A., Polakowska, K., Murzyn, K., Panz, T., Bialecka, A., Kasproicz, A., Jakubczak, A. & Krol, J. (2016). Multiple-locus variable-number tandem repeat fingerprinting as a method for rapid and cost-effective typing of animal-associated *Staphylococcus aureus* strains from lineages other than sequence type 398. *Journal of Medical Microbiology*, 65(12), 1494–1504.
- Löffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., Reitze, H. & Einsele, H. (1997). Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3311–3312.
- MacCannell, D. (2013). Bacterial strain typing. *Clinics in Laboratory Medicine*, 33(3), 629–650.
- Montgomery, G.W. & Sise, J.A. (1990). Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 33(3), 437–441.
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E. & Crandall, K. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 38–53.
- Ramírez, R. (2004). El Ordenamiento Territorial Municipal: Una Aproximación Desde Colombia. *Revista Del Instituto de Investigación FIGMMMGM*, 7(13), 31–36.



- Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G. M. & Mamma, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The New Microbiologica*, 37(1), 1–15.
- Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lämmler, C., Bogni, C. & Zschöck, M. (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research*, 163(3), 314–322.
- Reyes Velez, J. (2016). *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis epidemiology and control in Colombian dairy herds. Charlottetown, PE: University of Prince Edward Island. Recuperado de: <http://islandscholar.ca/islandora/object/ir:20242/datas-tream/PDF/download/citation.pdf>
- Ruiz Cortés, T., Orozco, S., Rodríguez, L.S., Idárraga, J. & Olivera, M. (2012). Factores que afectan el recuento de UFC en la leche en tanque en hatos lecheros del norte de Antioquia-Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 147-155. Recuperado de: <https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n1.2012.812>
- Sabat, A.J., Hermelijn, S.M., Akkerboom, V., Juliana, A., Degener, J. E., Grundmann, H. & Friedrich, A.W. (2017). Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. *Scientific Reports*, 7, 41050.
- Shepherd, M.A., Fleming, V.M., Connor, T.R., Corander, J., Feil, E.J., Fraser, C. & Hanage, W.P. (2013). Historical zoonoses and other changes in host tropism of *Staphylococcus aureus*, identified by phylogenetic analysis of a population dataset. *PLoS One*, 8(5).
- Shome, B.R., Das Mitra, S., Bhuvana, M., Krithiga, N., Velu, D., Shome, R., Isloor, S., Barbuddhe, S.B. & Rahman, H. (2011). Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1349–1356.
- Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D. E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S. & Kreiswirth, B.N. (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3556–3563.
- Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. & Coleman, D.C. (2011). Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3765–3773.



- Strommenger, B., Bralke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nübel, U. & Witte, W. (2008). *spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 574–581.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D. & Goering, R.V. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 18(6), 426–439.
- Van Belkum, A., Melles, D.C., Nouwen, J., van Leeuwen, W.B., van Wamel, W., Vos, M.C., Wertheim, H.F.L. & Verbrugh, H.A. (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(1), 32–47. Recuperado de: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.09.012](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.09.012)
- Van Belkum, A., Melles, D.C., Peeters, J.K., Van Leeuwen, W.B., Van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., Spalburg, E., De Neeling, A. J., Verbrugh, H.A. & Dutch Working Party on Surveillance Research of MRSA (SOM) (2008). Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398 in pigs and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), 479.
- Vargas, K.S. (2019). *Caracterización molecular de cepas Staphylococcus Aureus aisladas de leche de bovinos con mastitis en Antioquia*. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias.
- Vidal, J., Vargas, K., Parra, L., Rivera, A., Macias, D., Torres, G. & Olivera, M. (2016). Prevalence of mastitis causing bacteria isolated in two diagnostic laboratories in Antioquia (Colombia), between the years 2013 and 2015. *Global Veterinary Microbiology and Veterinary Medicine Summit*, 7(6), 38. doi:10.4172/2157-7579.C1.019
- Zhou, Q., Wang, M., Yuan, Y., Wang, X., Fu, R., Wan, H., Xie, M., Liu, M., Guo, X. & Zheng, Y. (2016). Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro. *Cell Stem Cell*, 18(3), 330–340.