



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

Detección de genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica.

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICA VETERINARIA**

Autora: Vera Zambrano Yuli Paulina

Tutora: Dra. Cruz Quintana Sandra Margarita

Cevallos – Ecuador

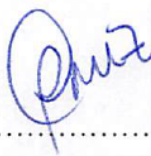
2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de tutor del Trabajo de Titulación con el tema: **“Detección de genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica.”** de la alumna Vera Zambrano Yuli Paulina, estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado en su totalidad, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento para la Titulación de Grado en la Universidad Técnica de Ambato.

Por lo tanto, autorizo la presentación de este, ante el organismo pertinente para ser sometido a la evaluación de los calificadores designados por el H. Consejo Directivo de la Facultad.

Cevallos, junio 2026



.....

Dra. Cruz Quintana Sandra Margarita

TUTORA

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Vera Zambrano Yuli Paulina**, portador de cédula de ciudadanía número **2200614176**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: **“Detección de genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica.”** es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

Cevallos, junio 2026



Vera Zambrano Yuli Paulina

AUTORA

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“Detección de genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica.”** como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médica Veterinaria, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o parte de él.

Cevallos, junio 2026



Vera Zambrano Yuli Paulina

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el Trabajo de Titulación, : **“Detección de genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica.”**, de Vera Zambrano Yuli Paulina, estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de conformidad con el Reglamento para la Titulación de Grado para obtener el título terminal de Tercer Nivel de la Universidad Técnica de Ambato, una vez revisado y calificado

Cevallos, junio 2026

REVISADO POR

.....
Dra. Cruz Quintana Sandra Margarita
TUTORA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACION

Para constancia firman:

.....
Ing. Vásquez Freytez Luis/Vásquez, PhD.
PRESIDENTE

.....
Ing. Aragadnay Yungán Ramón Gonzalo, PhD.
MIEMBRO TRIBUNAL DE GRADO

.....
Dr. Rosero Peñaherrera Marco Antonio, Mg
MIEMBRO TRIBUNAL DE GRADO

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por ser mi guía constante, la fuerza en mis momentos de debilidad y el arquitecto de mi camino.

A mi familia, por su apoyo incondicional en este trayecto. De manera muy especial, a mi madre Miryan Zambrano, por haber estado física, activa y plenamente junto a mí en cada paso, sosteniendo mis manos en los días más difíciles y celebrando mis pequeños triunfos en el día a día. Tu presencia constante ha sido mi mayor bendición, te amo con todo mi corazón.

A mi gato Gurrumino, el pilar silencioso y eterno de mi vida. Su paso por este mundo marcó un antes y un después en mí, convirtiéndose en la base sobre la cual edificué mis sueños y mi fuerza. A pesar del tiempo de su partida, el amor que me dio sigue intacto y se transformó en el motor que me impulsó a no rendirme jamás, gracias por haber sido mi primer y más puro refugio; hoy cumplo esta meta con tu luz guiando mi camino.

Y finalmente, a mí misma. Me dedico este logro con profundo amor y orgullo, porque reconozco la valentía que tuve para levantarme cada mañana, la fuerza para superar mis propios miedos y la perseverancia para no rendirme, esto es el reflejo de mi propio valor.

Vera Zambrano Yuli Paulina

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por guiarme a lo largo de este proceso de formación académica, brindándome salud, fortaleza y sabiduría para culminar con éxito esta etapa.

A mi amada madre, Miryan Zambrano, la persona que ocupa el lugar más sagrado en mi corazón y a quien amaré por siempre por sobre todas las cosas. Gracias por ser mi guía constante, mi pilar inamovible y el búnker seguro donde siempre pude descansar del estrés y la presión del mundo exterior. Tu presencia activa y física en cada día de mi vida y de este largo proceso universitario fue el motor que me impidió rendirme. Gracias por tus infinitas enseñanzas, por tus abrazos a tiempo y por sembrar en mí la seguridad de que era capaz de lograrlo todo.

A mi padre, Ramón Vera, y a mis hermanos, Juana, Isaac y Wacner, por su apoyo constante, por acompañarme en silencio y con paciencia en este largo trayecto, y por no dejarme sola en mi camino universitario.

A mi familia en general y de manera muy especial a mi primo Daniel Vargas, por estar siempre presente en los momentos clave, por brindarme su respaldo sincero y por tener siempre la disposición de escucharme con el corazón.

A Melany Paspuezán, por ser mi refugio y un apoyo vital en este viaje. Te agradezco con todo mi corazón por haber sido la persona más presente, empática, bella y comprensiva en cada etapa de este proceso; tu capacidad de escucharme y sostenerme en los momentos de mayor tensión, tu confianza en mí y tu presencia me han permitido llegar hasta aquí. Haberte conocido en esta universidad es una de las razones por las que no me arrepiento de haberla elegido ya que tu amistad es el regalo más valioso que me dio, Te quiero mucho.

A Rocío Ramos, gracias por las risas compartidas, momentos de estudio y por el honor de tu amistad. Gracias por ser esa primera mano amiga que encontré al iniciar la universidad y, sobre todo, por mantenerte firme, leal y constante a mi lado hasta el final del camino, empezamos juntas este sueño y poder cerrarlo contigo presente es una de las cosas que

más me hacen feliz, te quiero con todo mi corazón y aspiro podamos compartir muchos más buenos momentos a lo largo de nuestras vidas.

A Silvia Silva, gracias por cada una de las experiencias que vivimos, por el tiempo compartido dentro y fuera de las aulas, por permitir ingresar a tu vida y compartir y por hacer que los días pesados de estudio se transformaran en momentos llenos de complicidad y risas, te quiero mucho y te deseo lo mejor.

A Evelyn Sánchez, porque a pesar de la distancia o de que a veces pasemos meses sin hablar, el cariño que siento sigue intacto y la confianza ciega demuestran que somos almas gemelas. Gracias por ser esa amistad tan única e igual a mí, donde el tiempo no genera olvido y tu apoyo siempre se siente tan cerca como el primer día. No importa dónde estés, no importa la estación del año... si estamos juntas, se siente como el verano.

A mi gran amigo, Kevin Peñafiel, por ser esa amistad incondicional que me acompaña desde los días de la escuelita. Gracias por mantenerte firme a través de los años, por estar ahí para apoyarme cada vez que lo necesito y por tus palabras de aliento. Eres alguien a quien admiro profundamente y cuya presencia en mi vida valoro infinitamente.

Con profundo amor, a la memoria de mi querida amiga Alison Altamirano, tu ausencia física nos dejó un vacío que jamás se llenará, pero tu luz, tu alegría y tu recuerdo siguen caminando junto a mí. Estás presente en cada meta alcanzada y en el corazón de quienes tuvimos el honor de compartir la vida contigo.

A la memoria de mi fiel compañero Gurrumino. Aunque ya no estés presente físicamente en mis días, tu recuerdo, tu compañía silenciosa en las madrugadas de estudio y tu nobleza siguen siendo una de mis más grandes motivaciones para avanzar y entregar mi vida a esta hermosa profesión.

A mi tutora de tesis, Dra. Sandra Cruz, por su orientación acertada, su paciencia infinita y su acompañamiento incondicional a lo largo de esta trayectoria académica. Mi sincero agradecimiento por compartir su experiencia y sus rigurosos conocimientos científicos en

el laboratorio, pero, sobre todo, gracias por ser ese referente profesional y humano que me inspira a superar mis propios límites y a buscar la excelencia cada día.

Al Doc. Israel Tisalema, expreso mi más sincera gratitud por su generosidad al compartir sus conocimientos, por su guía acertada y por su motivación, virtudes que no solo enriquecieron mi formación como estudiante, sino que inspiraron mi visión como futura profesional de la Medicina Veterinaria.

Finalmente, agradezco a todas y cada una de las personas que han entrado a mi vida. Cada encuentro, coincidencia, lección y momento compartido ha dejado una huella imborrable, porque todas y cada una de ellas forman parte importante de la persona que soy ahora.

Vera Zambrano Yuli Paulina

ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN	iii
DERECHO DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT	xxii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Antecedentes investigativos	4

1.2 Fundamentación Teórica.....	13
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.2.2. Mastitis Bovina	14
1.2.3. Patogenia de <i>Staphylococcus aureus</i> en mastitis bovina	15
1.2.4. Impacto de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente en la inocuidad alimentaria (One Health).....	17
1.2.5. Genética molecular de <i>Staphylococcus aureus</i> y sus mecanismos de Patogenicidad	19
1.2.6. Mecanismos de transferencia horizontal de genes	21
1.2.7. Islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs).....	21
1.2.8 Resistencia y Virulencia: SCCmec, Profagos, Transducción y Plásmidos....	22
1.2.9. Determinantes Moleculares de Virulencia	23
1.2.9.3. Resistencia Antimicrobiana	26
1.2.10 Detección Molecular	27
1.3 Objetivos	32
1.3.1 Objetivo general	32
1.3.2 Objetivos específicos	32
CAPÍTULO II	33
METODOLOGÍA	33
2.1 Ubicación del experimento	33

2.1.1. Condiciones ambientales del lugar de investigación	33
2.1.2. Equipos y Materiales	34
2.1.3. Materiales biológico experimental	34
2.2 Equipos.....	34
2.2.1. Materiales	34
2.2.2. Reactivos	35
2.2.3. Materiales extras	36
2.2.4. Material Biológico	36
2.3. Tipo de investigación	37
2.4 Hipótesis.....	37
2.4.1 Hipótesis nula (H_0)	37
2.4.2 Hipótesis alternativa (H_1)	37
2.5 Selección de muestra.....	38
2.6. Variables de respuesta.....	39
2.6 Diseño de la Investigación	40
2.7 Manejo del experimento.....	40
2.7.1. Preparación de Agar Tripticasa de soya.....	41
2.7.2. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Tripticasa de soya	42
2.7.3 Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol salado	42

2.7.4. Tinción de Gram	43
2.7.5. Extracción de ADN por Aljanabi y Martínez (1997).....	44
2.7.6 Amplificación molecular por PCR.....	45
2.7.8 Electroforesis.....	47
2.8 Descripción de mecanismos moleculares de virulencia	48
2.9 Recolección de la información.....	48
CAPÍTULO III	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1 Selección y clasificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes aisladas de leche con mastitis subclínica	49
3.2 Ausencia del gen pvl-1 en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes aisladas de leche con mastitis subclínica	52
3.3 Ausencia del gen sec en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistentes aisladas de leche con mastitis subclínica	58
3.5 Mecanismos de acción molecular de virulencia asociados a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	62
CAPÍTULO IV	66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	66
Conclusiones	66
Recomendaciones.....	67

BIBLIOGRAFIA	68
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes investigativos sobre perfiles de virulencia y resistencia en <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente en productos lácteos y salud pública. ____	11
Tabla 2. Taxonomía de <i>Staphylococcus aureus</i> _____	13
Tabla 3. Características ambientales del catón Cevallos, Tungurahua. _____	33
Tabla 4. Primers y condiciones de PCR para amplificación de los genes de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> pvl y sec _____	46
Tabla 5. Composición del Master Mix utilizado por muestra para la amplificación de cada gen mediante PCR _____	46
Tabla 6. Análisis de la cantidad de muestras de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente recuperadas de congelación para el desarrollo de la investigación _____	50
Tabla 7. Resultados de ensayos PCR para la amplificación del gen pvl-1 en <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente _____	53
Tabla 8. Resultados de ensayos PCR para la amplificación del gen sec en <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente _____	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la patogenia de <i>Staphylococcus aureus</i> en mastitis subclínica bovina.....	16
Figura 2. Mapa Genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Figura 3. Datos de investigaciones previas sobre mastitis subclínica causada por <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (SARM) en los cantones de Tisaleo, Mocha, Pelileo y Pillaro, provincia de Tungurahua.	39
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la visualización del gen <i>pvl-1</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente.....	52
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la visualización del gen <i>sec</i> en <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente.....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Casos y tasas de otras intoxicaciones alimentarias bacterianas (A040-A049) por provincias en Ecuador, semana epidemiológica 01-53, año 2025.</i>	82
<i>Anexo 2. Reactivación de cepas, preparación de medios de cultivo y siembra</i>	82
<i>Anexo 3. Confirmación de pureza, siembra en medio específico (manitol salado y tinción de gram)</i>	83
<i>Anexo 4. Extracción de ADN método salino por (Aljanabi & Martinez, 1997).....</i>	83
<i>Anexo 5. Cuantificación de ADN.....</i>	83
<i>Anexo 6. Preparación de Master mix para PCR.....</i>	84
<i>Anexo 7. Condiciones de PCR para prueba de amplificación con el gen sec.....</i>	84
<i>Anexo 8. Electroforesis.....</i>	85
<i>Anexo 9. Visualización y documentación fotográfica de geles en transiluminador.</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ACME	Arginine Catabolic Mobile Element (Elemento Móvil Catabólico de Arginina)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BPP	Buenas Prácticas Pecuarias
CA-MRSA	Community-Associated MRSA (SARM asociado a la comunidad)
CC	Complejo Clonal (Clonal Complex)
CCR1	Receptor de quimoquina tipo 1
CDS	Secuencias codificantes (Coding DNA Sequences)
CMT	California Mastitis Test (Prueba de California para Mastitis)
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAD	Gobierno Autónomo Descentralizado
GC	Contenido de guanina-citosina
HGT	Horizontal Gene Transfer (Transferencia Horizontal de Genes)
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alternativa
IEC	Cluster de Evasión Inmune (Immune Evasion Cluster)
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1, IL-2, IL-6	Interleucinas 1, 2 y 6
IS	Secuencia de inserción (Insertion Sequence)
ISS	Secuencia de sitio de integración
LA-MRSA	Livestock-Associated MRSA (SARM asociado a la ganadería)
MDR	Multidrogo-Resistente
Mb	Megabases
MHC-II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II
MLST	Tipaje por Secuencia de Múltiples Loci

MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MSSA	Methicillin-Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Cloruro de sodio
orfX	Marco de lectura abierto X (Open Reading Frame X)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBP2a	Proteína de Unión a Penicilina 2a
PIA/PNAG	Polisacárido intracelular adhesivo / Poli-N-acetilglucosamina
PSM	Phenol-Soluble Modulins (Modulinas Solubles en Fenol)
PVL	Leucocidina de Panton-Valentine
RAM	Resistencia Antimicrobiana
SaPIs	Staphylococcal Pathogenicity Islands (Islas de Patogenicidad Estafilocócicas)
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino-Resistente
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec
SDS	Dodecilsulfato de sodio
sec	Staphylococcal Enterotoxin C (Enterotoxina Estafilocócica C)
ST	Sequence Type (Tipo de Secuencia)
Ta	Temperatura de anillamiento
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCR-β	Receptor de célula T, cadena beta
Tm	Temperatura de melting
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa

TSST-1
USA300

Toxina del Síndrome del Shock Tóxico tipo 1
Clon epidémico de CA-MRSA (designación de linaje)

WGS

Whole Genome Sequencing (Secuenciación Completa del Genoma)

bp

Pares de bases (base pairs)

RESUMEN

La mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus* representa el principal problema en producción lechera debido a las pérdidas económicas asociadas y al potencial riesgo que supone la circulación de cepas MDR. En este contexto, la presencia de genes de virulencia en aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) constituye un aspecto de interés epidemiológico, ya que la combinación de resistencia y virulencia puede favorecer la persistencia bacteriana y aumentar su capacidad patogénica. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia de los genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de SARM obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica procedentes de diferentes cantones de la provincia de Tungurahua, Ecuador. Para ello, se emplearon 80 muestras de cepas previamente conservadas, las cuales fueron reactivadas y verificadas microbiológicamente mediante pruebas fenotípicas convencionales. Posteriormente, se realizó extracción de ADN y la detección molecular de los genes de interés mediante la técnica PCR utilizando cebadores específicos. Los resultados obtenidos no evidenciaron amplificación para ninguno de los genes analizados, indicando ausencia de *pvl-1* y *sec* en los aislados evaluados. Adicionalmente, se efectuó una revisión de la evidencia científica relacionada con los mecanismos moleculares de acción de estos genes y con la interacción existente entre virulencia y resistencia antimicrobiana en *S. aureus*, destacando la participación de elementos genéticos móviles, sistemas regulatorios compartidos, procesos de co-selección ecológica y mecanismos de compensación del costo biológico. Estos hallazgos aportan información sobre el perfil de virulencia de cepas SARM asociadas a mastitis subclínica bovina en la región.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, SARM, *pvl*, *sec*, virulencia, resistencia antimicrobiana, mastitis subclínica bovina.

ABSTRACT

Bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* represents the primary problem in dairy production due to the associated economic losses and the potential risk posed by the circulation of MDR strains. In this context, the presence of virulence genes in isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is of epidemiological interest, as the combination of resistance and virulence may promote bacterial persistence and increase its pathogenic potential. The present study aimed to determine the presence of the virulence genes *pvl-1* and *sec* in MRSA isolates obtained from milk samples of cattle with subclinical mastitis from different cantons in the province of Tungurahua, Ecuador. For this purpose, 80 samples of previously stored strains were used, which were reactivated and microbiologically verified using conventional phenotypic tests. Subsequently, DNA extraction was performed, followed by molecular detection of the genes of interest via PCR using specific primers. The results obtained showed no amplification for any of the genes analyzed, indicating the absence of *pvl-1* and *sec* in the isolates evaluated. Additionally, a review was conducted of the scientific evidence related to the molecular mechanisms of action of these genes and the interaction between virulence and antimicrobial resistance in *S. aureus*, highlighting. These findings provide information on the virulence profile of MRSA strains associated with subclinical bovine mastitis in the region.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, PVL, SEC, virulence, antimicrobial resistance, subclinical bovine mastitis.

INTRODUCCIÓN

La producción lechera constituye una de las actividades pecuarias más importantes a nivel mundial, pasando de aproximadamente 524 millones de toneladas en la década de 1990 a más de 950 millones de toneladas en 2024, con un incremento superior al 75 % en los últimos 30 años y una tasa de crecimiento anual cercana al 1.4 %. La mayor parte de la producción global se concentra en Asia, particularmente en países como India y Pakistán, mientras que en Sudamérica destacan Brasil, Colombia y Chile, cuya competitividad se ha visto favorecida por condiciones climáticas adecuadas, infraestructura productiva, apoyo gubernamental y la implementación de Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) (FAO, 2025).

La leche representa uno de los alimentos de mayor valor nutricional para la población humana. De acuerdo con el modelo DELTA (Sustainable Nutrition Initiative), basado en el análisis de 29 nutrientes esenciales, la leche contribuye a la disponibilidad mundial de 28 de ellos. Además, constituye la principal fuente global de calcio (49 %), vitamina B2 (24 %), lisina (18 %) y grasa dietética (15 %), aportando también más del 10 % de la disponibilidad de proteínas, vitaminas A, B5 y B12, fósforo, potasio y diversos aminoácidos esenciales. Todo ello con apenas el 7 % del aporte energético alimentario total, lo que la convierte en un alimento con elevada densidad nutricional y alta relevancia para la seguridad alimentaria mundial (Sanjulián *et al.*, 2025; Smith *et al.*, 2022).

En este contexto, la producción láctea no solo constituye un componente esencial para la nutrición humana, sino también una actividad estratégica para el sustento económico de más de 600 millones de personas en el mundo. Sin embargo, bajo el enfoque One Health, el sistema de producción animal también se reconoce como un importante reservorio y vía de diseminación de resistencia antimicrobiana (RAM). Se estima que en 2020 fueron utilizadas aproximadamente 99,502 toneladas de antibióticos en animales de producción,

con proyecciones que superan las 107,000 toneladas para 2030; además, cerca del 73 % del consumo mundial de antimicrobianos corresponde al sector pecuario (**FAO, 2025; Ferroni *et al.*, 2020**)

Aunque el ganado bovino lechero presenta un menor consumo de antimicrobianos por kilogramo de peso vivo en comparación con otras especies de producción, el sector lácteo posee características epidemiológicas particulares que incrementan su relevancia sanitaria. La mastitis bovina, definida como la inflamación de la glándula mamaria generalmente asociada a infecciones bacterianas, representa la enfermedad de mayor impacto económico y sanitario en sistemas lecheros, siendo además la principal causa del uso de antibióticos en bovinos productores de leche. Se estima que los tratamientos intramamarios representan entre el 60 y 70 % del uso total de antimicrobianos en granjas lecheras. Adicionalmente, investigaciones recientes han identificado más de 100 genes de resistencia antimicrobiana en leche cruda y productos derivados, demostrando que los procesos de producción y fermentación pueden favorecer la persistencia y dispersión de dichos determinantes genéticos a lo largo de la cadena alimentaria (**Kerek *et al.*, 2024; Mulchandani *et al.*, 2023**).

Desde esta perspectiva, la vigilancia molecular de genes de resistencia y virulencia adquiere una importancia crítica, ya que ambos determinantes suelen encontrarse asociados dentro de los mismos elementos genéticos móviles, como plásmidos y profagos. Según lo descrito por **Rønning *et al.*, (2025)**, estos elementos pueden transportar simultáneamente genes de resistencia a β -lactámicos, macrólidos y aminoglucósidos junto con factores de virulencia como la leucocidina de Panton-Valentine (*pvl*) y enterotoxinas estafilocócicas (*sec*). En consecuencia, la presión selectiva ejercida por el uso de antimicrobianos no solo favorece la persistencia de cepas resistentes, sino también la circulación de variantes potencialmente más virulentas. Debido a ello, la identificación molecular de estos genes mediante herramientas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite rastrear su presencia a lo largo de toda la cadena de producción

láctea, desde la glándula mamaria hasta el producto final, contribuyendo al entendimiento epidemiológico de la transmisión bacteriana y al establecimiento de estrategias de control sanitario más precisas (**Roy *et al.*, 2024**).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

Sadat *et al.*, (2022) evaluaron la prevalencia, los perfiles de susceptibilidad antibiótica y algunos genes de toxinas de *Staphylococcus aureus* positivo para la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL) en leche cruda de vaca sin pasteurizar recogida en tiendas minoristas de la gobernación de Dakahliya, Egipto. Se analizaron 700 muestras de leche cruda, de las cuales se identificó *S. aureus* en el 41.1% (288/700). Entre los aislados, 113 resultaron positivos para *pvl* y fueron sometidos a análisis de genes de toxinas (*hla*, *tst*, *sea*, *seb*, *sec*, *see*, *seg*, *sei* y *selj*). Entre los PVL-positivos, el gen *sec* se detectó en el 0.9% (1/113), mientras que *sea* y *seb* se encontraron en el 44.2% y 6.2% respectivamente. El gen *blaZ* estuvo presente en el 84.9% y *mecA* en el 32.7% de los aislados PVL-positivos. Todos los SARM portadores de PVL mostraron resistencia multidroga, los hallazgos alertan sobre la presencia de clones virulentos de SARM PVL-positivos en leche de venta directa al público en Egipto, subrayando la necesidad de limitar el uso de fármacos beta-lactámicos en animales productores de alimentos.

Neelam *et al.*, (2022) caracterizaron los perfiles de virulencia y de genes de resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* asociados con mastitis clínica en ganado bovino en la región de Haryana (India), con el propósito de entender la patogénesis y mejorar las estrategias de tratamiento. Se analizaron 565 muestras de leche de vacas que presentaban signos clínicos de mastitis, de las cuales se obtuvieron 55 aislados de *S. aureus* confirmados mediante pruebas bioquímicas y la detección molecular del gen 23S rRNA

por PCR. La susceptibilidad antimicrobiana se evaluó frente a 14 antibióticos y se buscaron genes de resistencia (*mecA*, *blaZ*) y diversos factores de virulencia (*hla*, *hly*, *hly*, *tst*, *eta*, *etb* y enterotoxinas). La prevalencia de SARM fue del 23.64 % (13/55) al detectarse el gen *mecA*, mientras que *blaZ* responsable de resistencia a betalactámicos fue de 92.73% (51/55). Otros hallazgos incluyeron una alta frecuencia de los genes *hla* (49.09 %), *coa* (89.09 %) y *hly* (60 %), además de detectarse otras enterotoxinas como *seb* (9.09 %) y *sec* (1.82 %), lo que confirma un arsenal patogénico diverso en los casos de mastitis clínica en la región.

González-Machado et al., (2024) realizaron una revisión sistemática de 186 publicaciones científicas (61 sobre leche de tanque y 125 sobre productos lácteos) publicadas entre 2001 y 2024, con el objetivo de evaluar el papel de los alimentos lácteos en el riesgo de transmisión de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) a los humanos. El estudio analizó datos globales para determinar la prevalencia de SARM y la diversidad de linajes genéticos presentes en la cadena láctea. Se identificó que, aunque el SARM fue detectado en el 73.8 % de las investigaciones de leche de tanque y en el 68.8 % de las de productos lácteos, la prevalencia en la mayoría de los estudios individuales fue inferior al 5 %. Sin embargo, aproximadamente el 30 % de todos los aislados de *S. aureus* reportados en la literatura fueron confirmados como SARM. En cuanto a la caracterización molecular, se destaca que la resistencia es mediada predominantemente por el gen *mecA*, aunque se advierte sobre la presencia emergente de *mecC*. Los factores de virulencia más relevantes citados incluyen la capacidad de formación de biofilm y la presencia de diversas enterotoxinas estafilocócicas, subrayando que la leche cruda y los quesos blandos son los productos con mayor carga patogénica y riesgo epidemiológico.

Lakhundi & Zhang, (2018) realizaron una revisión exhaustiva sobre la evolución, caracterización molecular y epidemiología de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), con el objetivo de proporcionar una mejor comprensión de su origen, la diversidad de los elementos SCCmec y su propagación global en entornos hospitalarios,

comunitarios y ganaderos. El estudio describe la transición de SARM de ser un patógeno exclusivamente nosocomial a invadir la comunidad y crear reservorios en animales de compañía y de consumo. La resistencia es conferida principalmente por el gen adquirido *mecA* (y sus homólogos *mecB*, *mecC*, *mecD*), el cual codifica una proteína de unión a penicilina alterada (PBP2a) con baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos. En cuanto a su epidemiología, se destaca que en entornos ganaderos (LA-MRSA), el uso indiscriminado de antimicrobianos ha contribuido a una prevalencia que supera el 40 % en cerdos y el 20 % en ganado vacuno en ciertas regiones de Europa, identificándose linajes específicos como el **CC398** y **CC97**. A diferencia de las cepas hospitalarias, las de origen comunitario (CA-MRSA) suelen portar versiones más pequeñas de SCCmec y frecuentemente producen la citotoxina leucocidina de Panton-Valentine (PVL).

Shahid et al., (2023) evaluaron la prevalencia de *Staphylococcus aureus* para determinar los patrones de resistencia a los antimicrobianos e identificar los genes de virulencia de las cepas de SARM que causan mastitis subclínica bovina en el distrito de Faisalabad (Pakistán), se analizaron 249 muestras de leche mediante la prueba de detección rápida de mastitis (CMT) de las cuales 100 resultaron positivas. Los aislados positivos se identificaron mediante métodos microbiológicos estándar y se confirmaron molecularmente mediante la detección del gen *nuc* por PCR al igual que la resistencia a la metilicina y los factores de virulencia con cebadores específicos para *mecA*, *pvl*, *sec*, *clfA*, *hla*, *hly* y el operón *ica*. La prevalencia de *S. aureus* fue del 40 %, de estos el 30 % (12/40) de los aislados fueron confirmados como SARM al portar el gen *mecA*. En cuanto a la virulencia del SARM, el 92 % de las cepas portaban el gen *pvl*, el 42 % el gen *sec*, y también se detectaron los genes *clfA* (100 %), *hla* (75 %) e *icaD* (75 %).

Liu et al., (2022) investigaron la prevalencia, la susceptibilidad antimicrobiana y los genes de virulencia de *Staphylococcus aureus* en leches crudas de diferentes especies animales en China. Se analizaron 125 muestras de leche cruda provenientes de cabra (n = 50), búfala (n = 25), camello (n = 25) y yak (n = 25) recolectadas en 5 provincias. Se

aislaron 36 cepas de *S. aureus* (28.8%), de las cuales 6 identificadas en leche de cabra fueron confirmadas como SARM mediante la detección del gen *mecA*. El gen de enterotoxina más predominante fue *sec* (8/26, 30.8%), mientras que los genes de resistencia más frecuentes fueron *blaZ* (69.2%), *aac6'-aph2"* (50.0%) y *tet(M)* (38.5%), el 52.8% de las cepas fueron multirresistentes y todas formaron biopelícula. Los autores concluyeron que la prevalencia y la resistencia antimicrobiana de *S. aureus* en leches crudas representan una seria preocupación de salud pública, especialmente en leches de cabra.

Dehkordi et al., (2024) evaluaron la prevalencia, la resistencia a los antimicrobianos, la distribución de genes de virulencia y el tipaje SCCmec de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) aislados de leche cruda y productos lácteos en Shahrekord (Irán), con el fin de determinar el riesgo de transmisión de enfermedades a través de alimentos. Se analizaron 300 muestras de productos lácteos (incluyendo leche cruda de vaca, oveja, cabra, queso, yogur y helado), de las cuales se identificaron 82 aislados de *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas. Los aislados se confirmaron molecularmente y se evaluó su susceptibilidad a 13 antibióticos, además de detectar genes de virulencia y resistencia mediante PCR. La prevalencia de *S. aureus* fue del 27.3 % (82/300), siendo la leche cruda el producto con mayor contaminación; de estos, se confirmó que el 69.51% (57/82) aislados eran SARM. En cuanto a la virulencia, los genes más frecuentes detectados fueron *sec* 43.85% (25/57), *sed* 42.10% (24/57), *sea* 40.35% (23/57) y *seb* 38.59% (22/57), mientras que el análisis de SCCmec reveló que el tipo IV fue el más predominante (50 %), seguido por el tipo V (28.5 %), lo que sugiere una mayor presencia de cepas de origen comunitario en la cadena alimentaria láctea.

Pérez et al., (2020) evaluaron los factores de virulencia y los marcadores genéticos de resistencia antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina en cuatro estados de Brasil, con el fin de asociar estas características con la información de campo y la persistencia de la infección. Se analizaron 400 aislados provenientes de

vacas con mastitis, los cuales fueron identificados y evaluados mediante PCR para la detección de genes de resistencia y virulencia, además de pruebas fenotípicas para la formación de biofilm y actividad hemolítica. La prevalencia de resistencia molecular fue notable, el gen blaZ se detectó en el 83.02% de las muestras. En cuanto a la virulencia, el 98.5 % de las cepas portaban el gen *icaAD* relacionado con el biofilm, y se detectaron los genes de toxinas sec 1%, seb 0.5%, sed 0.25%, sea y see 0.1 %, pvl (luk) fue 3.5% y tst 0.74%. Se demuestra una baja frecuencia de estas toxinas específicas en los aislados brasileños analizados, pero una altísima capacidad de adhesión y hemólisis.

Wodaje *et al.*, (2025) determinaron la frecuencia de genes de virulencia y el perfil de susceptibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* en vacas lecheras con mastitis en Chagni, región Amhara, Etiopía. Se realizaron 140 muestras de leche de octubre de 2022 a junio de 2023 en una finca y 20 granjas de pequeños productores. El 45.7% (64/140) de las muestras fueron positivas para *S. aureus*, confirmado mediante métodos bacteriológicos estándar y moleculares. Entre los genes de virulencia, las enterotoxinas fueron prominentes: *sec* (11/64, 17.2%), *seb* (13/64, 20.3%), *seh* (9/64, 14.1%) y *see* (6/64, 9.4%), mientras que el gen de la leucocidina de PVL (*pvl*) se detectó en 11/64 (17.2%) de los aislados. El gen *tst* estuvo presente en 10.9% y la alfa-hemolisina (*hly*) en 10.9%, los aislados exhibieron alta sensibilidad a sulfametoxazol (87.5%) y gentamicina (79.7%), pero alta resistencia a cefoxitina (65.6%), el 23/64 (35.9%) de los aislados fueron multirresistentes, los autores destacaron la presencia significativa de genes virulentos y bacterias resistentes a antibióticos, subrayando la necesidad crítica de estrategias de control de mastitis.

Shahzad *et al.*, (2024) caracterizaron los aislados de *Staphylococcus aureus* recuperados de animales con mastitis subclínica en la región de Pothohar, Islamabad y Rawalpindi, Pakistán, con el objetivo de determinar su perfil de susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de genes de virulencia. Se recolectaron 278 muestras de leche de 17 granjas lecheras diferentes, las cuales fueron tamizadas mediante la prueba de California para

Mastitis (CMT), resultando un 62.2 % de las muestras positivas a mastitis subclínica. A partir de estas, se recuperaron 70 aislados de *S. aureus* confirmados mediante cultivo en agar sal manitol y PCR. Los resultados revelaron que el 21 % (15/70) de los aislados fueron identificados como SARM al portar el gen *mecA*, y el 52 % del total de aislados mostraron perfiles de multirresistencia (MDR). En cuanto a la caracterización molecular de la virulencia, se detectó una alta prevalencia de los genes *hla* (95.7 %) e *hly* (84.2 %), mientras que el gen de la leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*) se encontró en el 5.7 % de los aislados 4/70.

Tenezaca Lliguin et al., (2025) investigaron la presencia de *Staphylococcus aureus* en las superficies de los teléfonos móviles de estudiantes del último año de la carrera de Enfermería en Cuenca (Ecuador), con el objetivo de evaluar el papel de estos dispositivos como reservorios de cepas resistentes a la meticilina (SARM) en el entorno académico-hospitalario. Se analizaron 76 muestras obtenidas mediante hisopado de la superficie de los teléfonos, las cuales fueron procesadas por métodos microbiológicos estándar y confirmadas molecularmente mediante la detección del gen *nucA* por PCR, obteniendo que el 11.84% (9/76) era *Staphylococcus aureus* y de estas el 44.44% (4/9) pertenecía a SARM y se evaluó el perfil de susceptibilidad antimicrobiana frente a diversos antibióticos. En cuanto a la virulencia, se reportó que el 0 % de los aislados portaban el gen de la leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*), aunque se observó una alta prevalencia de hemolisinas *hla* 100% (9/9) y *hly* 88,88% (8/9), y presencia de algunas enterotoxinas sea 11,11 % (1/9) y sec 22,22% (2/9).

Balarezo Carvajal, (2025) evaluó la presencia de genes de resistencia a beta-lactámicos y el factor de virulencia *pvl* en aislados de *Staphylococcus aureus*. Se tamizaron 80 vacas en ordeño con la prueba de California Mastitis Test (CMT) y se seleccionaron 12 animales positivos, más 5 operarios para muestreo nasal. en la provincia de Tungurahua (Ecuador). Tras el análisis molecular, se identificó que 17/17 muestras fueron positivas para el gen *nucA* (12 en leche y 5 en operarios) confirmando que todos los aislados pertenecían a *S.*

aureus. En cuanto a la caracterización genética, los resultados fueron negativos para los genes de estudio, ya que el 0 % de los aislados (0/17) portaban el gen *mecA* y el 0 % portaban el gen de virulencia *pvl*. Estos hallazgos indican que, aunque existe presencia de *S. aureus* resistente a penicilina, no se detectaron cepas de SARM ni la citotoxina PVL en ese cantón en específico (Quero-Tungurahua) por lo menos en las condiciones evaluadas.

Otro estudio en Chinta realizado por **Ren et al., (2020)** utilizó 84 muestras de leche de mastitis subclínica en dos granjas (A y B) obteniendo 65 aislados *S. aureus* analizados por PCR para genes de enterotoxinas (*sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*), toxina shock tóxico (*tst*), PVL (*pvl*), hemolisinas y adhesinas. El 33.8% de los aislados portaban *sec* y 40% portaban *pvl*. Hubo diferencias significativas entre granjas (granja B: 30.8% *sec*, 32.3% *pvl* vs granja A: 3.1% *sec*, 7.7% *pvl*) y todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina. Se determinó alta prevalencia de *sec* y *pvl* en *S. aureus* de mastitis subclínica, con variación significativa entre granjas, sugiriendo que el manejo influye en la diseminación de cepas virulentas.

En Bangladesh, **Hoque et al., (2022)** analizaron 500 muestras de leche de búfalas con mastitis subclínica de los cuales 109 aislados fueron identificados como *S. aureus* y posteriormente se analizaron por antibiograma, PCR para genes de resistencia (*mecA*) y virulencia (*pvl*, enterotoxinas *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*). El 96% de los *S. aureus* eran MDR. 29 aislados portaban *mecA* y 16 portaban *pvl*. Las enterotoxinas detectadas incluyeron *sea* (11.9%), *sec* (7.4%), *sed* (4.6%). Hubo 46 aislados portadores de plásmidos que eran MDR. Este estudio establece, que al igual que en vacas *Staphylococcus aureus* es la principal causa de mastitis subclínica en búfalas, y la emergencia de cepas MDR con genes de virulencia (*pvl*, *sec*) y resistencia (*mecA*) representa una amenaza para la salud pública y animal.

Todos estos estudios exploran directamente la relación entre factores de virulencia y resistencia antimicrobiana en MRSA (Tabla 1). Debido a que la evidencia apunta a que

puede existir una relación compleja que va desde la co-localización genética hasta compensaciones evolutivas que definen la patogenicidad de una cepa. El estudio noruego de **Rønning *et al.*, (2025)** documentó que el 48.4% de los plásmidos en cepas MDR-MRSA eran plásmidos convergentes, es decir, portaban combinaciones de genes de resistencia y virulencia en el mismo elemento (plásmidos, transposones, bacteriófagos, SCCmec). Por tanto, la implicación clínica es que no se puede predecir la virulencia de una cepa por su perfil de resistencia, ni viceversa: hace falta caracterización molecular para cada aislado.

Tabla 1. *Antecedentes investigativos sobre perfiles de virulencia y resistencia en Staphylococcus aureus meticilino resistente en productos lácteos y salud pública.*

Autor/año	Lugar	Tipo de muestra	Nº total de muestras	<i>S. aureus</i> meticilino resistente	Nº de muestras positivas al gen pvl	Nº de muestras positivas al gen sec
Sadat <i>et al.</i>, (2022)	Dakahliya (Egipto)	Leche cruda	700	41.1 % (288/700)	39% (113/288)	0.9 % (1/113)
Neelam <i>et al.</i>, (2022)	Haryana (India)	Leche cruda	565	2.4 % (13/565)	-	1.8 % (10/565)
Shahid <i>et al.</i>, (2023)	Faisalabad (Pakistán)	Leche cruda	249	5 % (12/249)	92% (11/12)	42% (5/12)
Liu <i>et al.</i>, (2022)	China	Leche cruda	125	28.8% (36/125)	-	30.8% (8/26)

Dehkordi <i>et al.</i>, (2024)	Shahrekord (Irán)	Leche cruda y productos lácteos	300	19% (57/300)	43.85% (25/57)	-
Pérez <i>et al.</i>, (2020)	Brasil	Leche cruda	400	83% (332/400)	3.5% (11/332)	1% (3/332)
Shahzad <i>et al.</i>, (2024)	Pakistán	Leche cruda	278	5.4% (15/278)	26.67% (4/15)	-
Wodaje <i>et al.</i>, (2025)	Chagni (Etiopía)	Leche	140	100% (8/8)	100% (8/8)	0% (0/8)
Tenezaca Lliguin <i>et al.</i>, (2025)	Cuenca, Ecuador	Residuos de superficies de celulares	76	45.75% (64/170)	17.2% (11/64)	17.2% (11/64)
Ren <i>et al.</i>, (2020)	China	Leche cruda	84	100% (84/84)	40% (33/84)	33.8% (28/84)
Hoque <i>et al.</i>, (2022)	Bangladesh	Leche cruda	500	96% (480/500)	3.2% (16/500)	7.4% (37/500)

1.2 Fundamentación Teórica

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, inmóvil, no esporulada y catalasa positiva, que se dispone típicamente en agrupaciones semejantes a racimos debido a su patrón de división celular en múltiples planos, se trata de un microorganismo anaerobio facultativo con una elevada capacidad de adaptación metabólica que le permite colonizar diversos nichos ecológicos en humanos y animales. En medicina veterinaria, es uno de los principales agentes etiológicos de la mastitis bovina, particularmente de las formas subclínicas y crónicas, debido a su capacidad para adherirse al tejido mamario, invadir estructuras profundas y persistir frente a los mecanismos inmunológicos del hospedador (Rainard *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2026).

Tabla 2. *Taxonomía de Staphylococcus aureus*

Taxonomía de <i>S. aureus</i>	
Dominio	Bacteria
Reino	Bacillati
Filo	Bacillota
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Genero	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>

Obtenido de: (National Center for Biotechnology Information, 2026)

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus*, cuya clasificación taxonómica vigente se presenta en la Tabla 2. Esta especie fue descrita por primera vez por Friedrich Rosenbach en 1884, quien la diferenció de otras especies estafilocócicas mediante características fenotípicas como la pigmentación dorada de sus colonias y su capacidad de producir coagulasa. Posteriormente, fue incorporada de manera oficial a las listas aprobadas de nomenclatura bacteriana y actualmente se reconocen dos subespecies dentro de la especie. A pesar de las modificaciones propuestas en años recientes para la clasificación de algunos miembros del género *Staphylococcus* basadas en estudios filogenéticos, *S. aureus* ha conservado su ubicación taxonómica tradicional (**Madhaiyan et al., 2020**).

1.2.2. Mastitis Bovina

La mastitis bovina se presenta en dos formas principales con diferencias sustanciales en su presentación, diagnóstico e impacto económico. La mastitis clínica, aunque menos prevalente entre 6.8% y 17%, se caracteriza por signos sistémicos en la vaca y anomalías visibles en la ubre y la leche, lo que permite su detección y tratamiento tempranos. Los patógenos más frecuentemente asociados con esta forma son *Escherichia coli*, que tiende a causar mastitis clínica aguda, y *Streptococcus uberis*, reportado como el agente más común en sistemas lecheros de Australia con 39.2% de los casos clínicos. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* también está presente en una proporción significativa de casos clínicos a nivel global, aunque con menor predominancia que en la forma subclínica (**Krishnamoorthy et al., 2021; Mbindyo et al., 2020**).

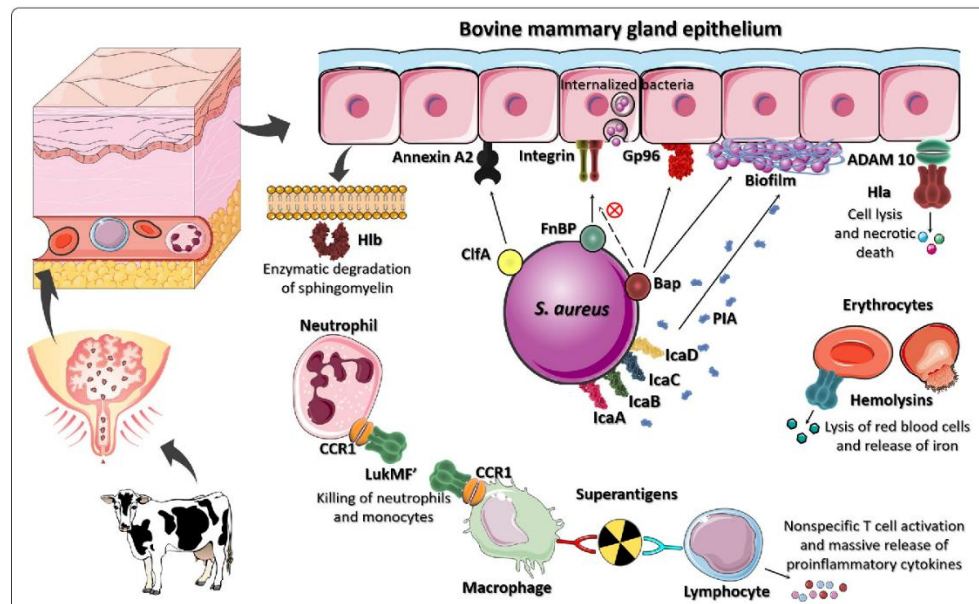
Por el contrario, la mastitis subclínica es la forma más prevalente en hatos lecheros de todo el mundo, con frecuencias que oscilan entre 53% y 73.1% dependiendo de la región y las condiciones de manejo. Esta forma es particularmente problemática porque cursa sin signos clínicos observables, lo que dificulta su diagnóstico sin pruebas auxiliares como el California Mastitis Test (CMT) o el recuento de células somáticas, permitiendo por su patogenia que persista en el hato por períodos prolongados (Figura 1.) y cause mayores

pérdidas económicas que la mastitis clínica debido a la reducción invisible de la producción láctea. A nivel mundial, *Staphylococcus aureus* es reconocido como el principal patógeno causante de mastitis subclínica, con una prevalencia agrupada del 25%. Las especies de *Staphylococcus* en su conjunto son más determinantes en la mastitis subclínica que en la clínica, actuando como patógenos contagiosos que se propagan principalmente durante el ordeño y generan pérdidas productivas sin manifestaciones externas evidentes (Ali *et al.*, 2021; Dyson *et al.*, 2022).

1.2.3. Patogenia de *Staphylococcus aureus* en mastitis bovina

La patogenia de *Staphylococcus aureus* en la mastitis subclínica bovina inicia cuando el microorganismo ingresa a la glándula mamaria a través del canal del pezón. Posteriormente, la bacteria se fija al epitelio mamario mediante proteínas de adhesión pertenecientes al grupo MSCRAMMs, entre ellas FnBPA, FnBPB, ClfA, ClfB y Cna, las cuales reconocen componentes de la matriz extracelular como fibronectina, fibrinógeno y colágeno. La interacción entre las proteínas de unión a fibronectina y las integrinas celulares desencadena modificaciones en el citoesqueleto de la célula hospedadora, favoreciendo la internalización bacteriana. Una vez dentro de la célula, *S. aureus* puede sobrevivir intracelularmente, escapar de mecanismos endosomales y evitar la destrucción mediada por neutrófilos (Figura 1). Esta capacidad invasiva, junto con variaciones genéticas relacionadas con evasión inmune y proteínas de superficie descritas en cepas subclínicas, favorece el establecimiento de infecciones persistentes y recurrentes (Campos *et al.*, 2022; Krishnamoorthy *et al.*, 2021).

Figura 1. Esquema de la patogenia de *Staphylococcus aureus* en mastitis subclínica bovina.



Obtenido de: (Campos *et al.*, 2022)

Otro mecanismo importante en la persistencia de la infección es la formación de biopelículas, estructuras compuestas principalmente por el polisacárido PIA/PNAG sintetizado por el locus *ica*. Estas biopelículas actúan como barreras protectoras frente a la respuesta inmune del hospedador y frente a la acción de antimicrobianos, facilitando la supervivencia prolongada del microorganismo en la glándula mamaria. Diversos estudios han demostrado que las cepas asociadas a mastitis subclínica suelen pertenecer al grupo *agrI*, caracterizado por una elevada capacidad invasiva y una producción moderada de biopelícula, diferenciándose de las cepas clínicas pertenecientes frecuentemente al grupo *agrII*. Además, se ha reportado que ciertos linajes con alta prevalencia dentro del hato presentan baja citotoxicidad, ausencia de cápsula y fuerte capacidad de formación de

biopelículas, características que favorecen una diseminación silenciosa sin inducir inflamación aguda evidente (Campos *et al.*, 2022; Grunert *et al.*, 2018).

Para contrarrestar la respuesta inmune innata, *S. aureus* produce diversos factores de virulencia. Entre ellos destaca la leucotoxina LukMF', capaz de destruir neutrófilos mediante su unión al receptor CCR1. Asimismo, proteínas como ClfA interfieren con la opsonización dependiente de complemento al afectar la actividad de C3b, reduciendo la fagocitosis bacteriana. Otras toxinas importantes incluyen Hla y Hlb, las cuales generan daño tisular mediante formación de poros y degradación de esfingomielina en membranas celulares, provocando necrosis del tejido mamario y lisis eritrocitaria para la obtención de hierro. De igual manera, la enterotoxina C (SEC), una de las enterotoxinas más frecuentes en aislados bovinos, induce una intensa respuesta inflamatoria en la glándula mamaria a través de la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6. A nivel epidemiológico, la forma subclínica predomina debido a que *S. aureus* actúa como un patógeno contagioso capaz de mantenerse en el hato causando pérdidas productivas importantes sin generar signos clínicos evidentes, lo que dificulta considerablemente su diagnóstico y control (Campos *et al.*, 2022; Fang *et al.*, 2019; Rocha *et al.*, 2019).

1.2.4. Impacto de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en la inocuidad alimentaria (One Health)

La mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus* representa uno de los desafíos más importantes para la producción lechera mundial debido a su impacto económico, sus implicaciones en bienestar animal y su potencial zoonótico, lo que la convierte en un problema que trasciende las fronteras de la medicina veterinaria y la salud pública. Touaitia, Mairi, *et al.*, (2025) integran el concepto One Health señalando que la transmisión de *S. aureus* entre bovinos y humanos, la contaminación de la leche y el ambiente, y el uso intensivo de antimicrobianos en granjas lecheras conforman un ciclo de riesgo que requiere vigilancia integrada y estrategias de control coordinadas entre los

sectores animal, humano y ambiental. Otros estudios, documentan que los linajes clonales de *S. aureus* asociados a ganado, especialmente ST398, han expandido su diversidad genética globalmente y muestran una tendencia creciente hacia la multirresistencia, lo que agrava el riesgo para la salud humana y animal (Silva *et al.*, 2023; Touaitia, Ibrahim, *et al.*, 2025).

La presencia de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) en leche cruda y productos lácteos es un fenómeno global documentado, pues se han detectado linajes de alto riesgo como ST398 y MRSA-ST59, estrechamente relacionados genéticamente con aislados de cerdos, infecciones hospitalarias y productos congelados, lo que evidencia la circulación de clones virulentos entre animales de producción, alimentos y humanos. Demostrando principalmente que los reservorios animales albergan cepas con perfiles de resistencia que comprometen las últimas líneas terapéuticas en medicina humana. Por lo tanto, se advierte que, aunque el número de infecciones invasivas por MRSA está disminuyendo en Europa y EE. UU., la adquisición de nuevos determinantes de virulencia y resistencia por parte de los linajes LA-MRSA constituye una amenaza creciente para la salud pública que justifica mejorar los sistemas de monitoreo y tipificación molecular (Das *et al.*, 2025; Liu *et al.*, 2023).

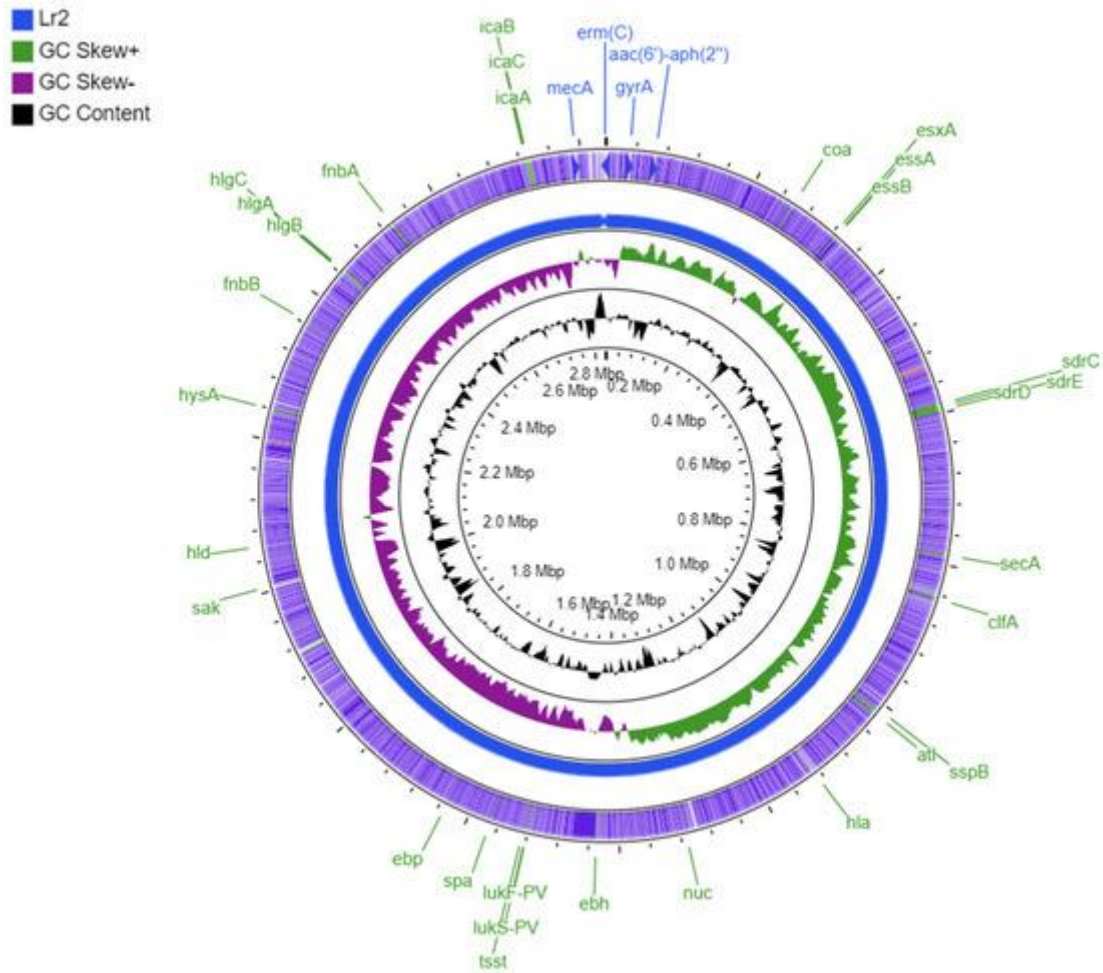
Particularmente los aislados de MRSA de origen bovino portan un amplio repertorio de genes de virulencia que potencian su capacidad de causar enfermedad en humanos, incluyendo enterotoxinas (SEa–SEe), toxina del shock tóxico (TSST-1), leucotoxina PVL, hemolisinas y genes de formación de biofilm (*icaA*, *icaD*, *bap*) que facilitan la persistencia en superficies y la resistencia a antibióticos. También, se ha establecido que el personal en contacto directo con animales tales como, veterinarios, ordeñadores y granjeros, tiene un riesgo significativamente mayor de colonización por LA-MRSA, y que las medidas de bioseguridad como la rotación de antibióticos, el lavado de manos y el uso de equipos de protección reducen la carga bacteriana en las granjas. Con esto se enfatiza que, bajo el paraguas One Health, las intervenciones deben ser colaborativas entre los

sectores salud humana, animal y ambiental, integrando el monitoreo de resistencia, la educación sobre uso prudente de antimicrobianos y el desarrollo de alternativas terapéuticas como bacteriófagos, péptidos antimicrobianos y nanotecnología para romper el ciclo de transmisión y preservar la eficacia de los antibióticos (Fetsch *et al.*, 2021; Touaitia, Ibrahim, *et al.*, 2025).

1.2.5. Genética molecular de *Staphylococcus aureus* y sus mecanismos de Patogenicidad

El genoma de *S. aureus* consiste en un cromosoma circular de aproximadamente 2.8 millones de pares de bases (Mb) con un contenido de GC del 32-33%, más cero a varios plásmidos de tamaño variable (Figura 2). El genoma se divide en un core-genoma, genes presentes en la gran mayoría de las cepas, que codifican funciones esenciales como metabolismo de aminoácidos (16% de las CDS), carbohidratos (13%), metabolismo proteico (10%), replicación, transcripción y traducción; y un genoma accesorio o pan-genoma que contiene genes no esenciales responsables de la adaptación a nichos específicos. Utilizando más de 84,000 genomas secuenciados, se definieron 145 cepas genéticamente distintas dentro de la especie mediante un umbral de identidad de nucleótidos promedio (ANI) del 99.5%, y estimaron un pan-genoma total que puede oscilar entre 4,250 y 21,358 familias génicas dependiendo de la diversidad de la muestra y los métodos bioinformáticos empleados. Los genes no-core se clasifican en tres categorías según su frecuencia poblacional: (i) genes raros (<10% de los genomas), que se concentran cerca del origen de replicación y están implicados en adaptaciones de nicho recientes; (ii) genes de frecuencia intermedia difusos entre cepas (strain-diffuse), asociados a profagos, SaPIs y SCCmec, con alta tasa de transferencia horizontal; y (iii) genes de frecuencia intermedia concentrados en cepas (strain-concentrated), que se segregan estrechamente con el fondo genético del core y se ubican principalmente en la isla genómica vSaβ (Raghuram *et al.*, 2024).

Figura 2. Mapa Genómico de *Staphylococcus aureus*



Nota. Mapa genómico circular de la cepa Lr2 visualizado con CGViewer, en el que se muestran los factores de virulencia en color verde claro y los determinantes de resistencia a antibióticos en azul claro.

Obtenido de: (Ullah *et al.*, 2022).

1.2.6. Mecanismos de transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes (THG) constituye uno de los procesos evolutivos más determinantes en *Staphylococcus aureus*, permitiendo la adquisición de genes de resistencia antimicrobiana y factores de virulencia mediante mecanismos no clonales. Aunque la conjugación plasmídica y, en menor medida, la transformación puede contribuir a la incorporación de material genético exógeno, el mecanismo predominante en esta especie es la transducción mediada por bacteriófagos temperados. A través de este proceso, fagos lisogénicos pueden movilizar genes de virulencia como *pvl* o elementos genéticos móviles como las islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs), facilitando su integración estable en nuevas cepas bacterianas. Esta capacidad convierte a la transducción fágica en el principal motor de expansión de perfiles hipervirulentos y resistentes en *S. aureus*, explicando la elevada variabilidad genética observada entre aislados clínicos y su rápida adaptación a presiones selectivas dentro de sistemas de producción animal y ambientes hospitalarios (Humphrey *et al.*, 2021; Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025).

1.2.7. Islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs)

Las SaPIs (Staphylococcal Pathogenicity Islands) son elementos genéticos móviles integrados en sitios específicos del cromosoma bacteriano, usualmente flanqueados por secuencias repetidas directas y regulados por represores específicos como StI. Estas islas representan uno de los mecanismos más sofisticados de adquisición de virulencia en *S. aureus*, ya que contienen genes para superantígenos, enterotoxinas, toxinas exfoliativas y factores inmunomoduladores (Penadés *et al.*, 2025; Rafael Ciges-Tomas *et al.*, 2019).

La movilización de SaPIs depende de bacteriófagos auxiliares, cuyos ciclos de inducción permiten la escisión, replicación, encapsulación y transferencia de estas islas hacia nuevas cepas bacterianas. Este fenómeno incrementa significativamente la plasticidad genética poblacional y favorece la rápida emergencia de clones hipervirulentos. Genes como *sec* suelen encontrarse asociados a estas islas, particularmente en cepas vinculadas a intoxicación alimentaria o infecciones mamarias persistentes, consolidando su importancia epidemiológica en sistemas de producción lechera (Cervera-Alamar *et al.*, 2018; Patel & Rawat, 2023)

1.2.8 Resistencia y Virulencia: SCCmec, Profagos, Transducción y Plásmidos

El Cassette Cromosómico Staphylococcal *mec* (SCCmec) es el elemento responsable de la resistencia a meticilina (MRSA) al portar el gen *mecA*, que codifica la proteína PBP2a con baja afinidad por los beta-lactámicos 5. Su mecanismo de HGT se basa en recombinasas específicas (*ccrAB* o *ccrC*) que permiten su escisión e integración en el sitio *attB* cerca del gen *orfX*. Además de la resistencia, ciertos tipos de SCCmec portan el locus *psm-mec*, que produce modulinas solubles en fenol (PSM) con actividad citolítica y reguladora de la virulencia. Otros elementos como Arginine Catabolic Mobile Element (ACME), asociado a SCCmec tipo IV en el clon USA300, mejoran la colonización y supervivencia en la piel del huésped (Jiang *et al.*, 2023; Miragaia, 2018)

Los profagos son genomas virales integrados que actúan como los principales vehículos de HGT en *S. aureus* a través de la transducción. Pueden mediar la transferencia mediante tres variantes, generalizada (error en el empaquetamiento), especializada (error en la escisión) o la transducción lateral, que permite la transferencia de grandes regiones cromosómicas a frecuencias extremadamente altas, a su vez, son portadores de factores de virulencia esenciales como la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), la estafiloquinasa y el Cluster de Evasión Inmune (IEC) (Hatoum-Aslan, 2021; Humphrey *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023).

Por otra parte, los plásmidos son elementos extra cromosómicos que se transfieren principalmente por conjugación (contacto célula a célula mediado por sistemas tipo pSK41) o por movilización mediante fagos y SaPIs. Estos elementos son críticos para la multirresistencia a antibióticos (ej. mupirocina, vancomicina o aminoglucósidos) y pueden portar operones de resistencia a metales pesados, además de factores de virulencia adicionales que complementan el arsenal de la bacteria (**Humphrey *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2023**)

1.2.9. Determinantes Moleculares de Virulencia

Los determinantes moleculares de virulencia son moléculas específicas, generalmente proteínas codificadas por genes del genoma accesorio, que confieren al patógeno la capacidad de colonizar tejidos, evadir la respuesta inmune y causar daño celular directo. A diferencia de los genes del core genoma, estos determinantes suelen residir en elementos genéticos móviles como profagos, islas de patogenicidad (SaPIs) y plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal entre cepas y especies. La expresión de la mayoría de estos factores está regulada por sistemas de detección de quorum como el locus *agr*, que coordina la producción de toxinas y enzimas en respuesta a la densidad bacteriana. Algunos determinantes, como las toxinas citolíticas y los superantígenos, actúan directamente sobre células del hospedador, mientras que otros, como las adhesinas de la familia MSCRAMM, facilitan la adhesión inicial a tejidos como paso crítico para establecer la infección. La combinación particular de determinantes moleculares en cada cepa define su tropismo de hospedador, su potencial patogénico y su capacidad para generar infecciones persistentes (**Algammal *et al.*, 2020; Touaitia, Ibrahim, *et al.*, 2025**).

1.2.9.1 Leucocidina de Panton-Valentine (PVL)

Es una exotoxina bicomponente perteneciente a la familia de leucocidinas sinérgicas producidas por ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*. Esta toxina está codificada por los genes **lukS-PV** y **lukF-PV**, comúnmente agrupados bajo la denominación general de gen *pvl*, los cuales suelen encontrarse integrados en bacteriófagos lisogénicos móviles capaces de transferirse horizontalmente entre cepas bacterianas (**Liu et al., 2023; Touaitia, Mairi, et al., 2025**).

El mecanismo de acción de PVL inicia con la unión secuencial de sus subunidades a receptores específicos presentes en la membrana celular de leucocitos, particularmente C5aR y C5L2. Posteriormente, ambas subunidades oligomerizan formando poros transmembrana que alteran la integridad celular, provocando desequilibrio osmótico, entrada masiva de calcio, activación inflamatoria y lisis celular. La destrucción de células inmunológicas favorece una marcada evasión de la respuesta inmune innata, amplifica procesos inflamatorios locales y genera liberación de mediadores tisulares que incrementan el daño en tejidos infectados (**Hatoum-Aslan, 2021; Rocha et al., 2019**).

Clínicamente, la presencia del gen *pvl* se ha asociado con infecciones cutáneas necrotizantes, abscesos recurrentes, neumonía necrotizante y cuadros de elevada agresividad inflamatoria. Aunque su frecuencia en mastitis bovina suele ser menor en comparación con cepas humanas, su detección representa un marcador relevante de potencial virulencia incrementada, ya que podría favorecer procesos inflamatorios mamarios más agresivos o contribuir a perfiles zoonóticos emergentes (**Sadat et al., 2022**).

1.2.9.2 Enterotoxina C (gen sec)

Codifica la enterotoxina estafilocócica tipo C (SEC), una de las principales exotoxinas superantigénicas producidas por *Staphylococcus aureus*. Esta toxina pertenece al grupo de enterotoxinas pirógenas capaces de inducir una activación inmunológica masiva e inespecífica mediante interacción simultánea con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) en células presentadoras de antígeno y regiones variables β de receptores T (TCR-V β) en linfocitos T (Fang *et al.*, 2019; Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025)

Como resultado, se produce una liberación exacerbada de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-1, IL-2, TNF- α e IFN- γ , desencadenando procesos inflamatorios intensos, fiebre, alteraciones sistémicas y daño tisular. En el contexto alimentario, SEC posee además relevancia por su termo estabilidad, lo que significa que puede conservar actividad biológica incluso después de ciertos tratamientos térmicos aplicados a productos lácteos contaminados, representando un riesgo importante para la inocuidad alimentaria (Campos *et al.*, 2022; Shalaby *et al.*, 2024)

Ecuador reporta 10.197 intoxicaciones alimentarias bacterianas en 2025 (Anexo 1), y la literatura muestra que las enterotoxinas estafilocócicas (especialmente SEA, SEC, SED) están entre las causas más frecuentes de brotes de origen alimentario a nivel global. Sin embargo, no hay datos epidemiológicos locales que discriminen cuántos de esos 10.197 casos corresponden a toxinas estafilocócicas específicas como SEC (Ministerio de Salud Pública, 2025; Roy *et al.*, 2024).

En mastitis bovina, la presencia de *sec* se ha relacionado con cepas capaces de persistir en tejido mamario y alterar significativamente la calidad microbiológica de la leche, no solo por el proceso infeccioso, sino también por la potencial contaminación con toxinas.

Aunque no todos los aislados de *S. aureus* portan este gen, su identificación resulta epidemiológicamente relevante debido a su doble implicación: persistencia infecciosa intramamaria y riesgo de transmisión alimentaria. Esto convierte al gen *sec* en un objetivo molecular particularmente valioso en estudios enfocados en salud animal, seguridad alimentaria y vigilancia zoonótica (Brdová *et al.*, 2024; Grunert *et al.*, 2018).

1.2.9.3. Resistencia Antimicrobiana

La resistencia a meticilina en *S. aureus* está mediada principalmente por la adquisición del gen *mecA*, localizado en el elemento genético móvil SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec), que se integra en el locus *orfX* del cromosoma bacteriano. El gen *mecA* codifica una proteína de unión a penicilina alternativa, PBP2a (o PBP2), con 668 aminoácidos y baja afinidad por todos los antibióticos beta-lactámicos. En cepas sensibles (MSSA), la síntesis de peptidoglicano depende de las PBP1-4, que son inactivadas por los beta-lactámicos mediante acilación de sus dominios transpeptidasa; en MRSA, PBP2a mantiene su actividad transpeptidasa incluso bajo exposición al antibiótico, permitiendo el entrecruzamiento de los puentes de pentaglicina entre las cadenas de peptidoglicano, esta expresión de *mecA* está regulada por los genes *mecRI* sensor-transductor y *mecI* represor, en ausencia de beta-lactámicos, MecI reprime el promotor de *mecA*, pero tras la exposición al antibiótico, MecR1 sufre autoproteólisis y escinde a MecI, desreprimiendo la transcripción. Existen 13 tipos principales de SCCmec (I-XIII), cuyas regiones J1-J3 pueden portar genes de resistencia adicionales, generando frecuentemente fenotipos de multirresistencia (MDR) que incluyen aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas. El mecanismo de resistencia se ha diseminado globalmente a través de la transferencia horizontal del cassette SCCmec mediada por recombinasas Ccr, lo que ha dado lugar a clones epidémicos como USA300, ST80 y ST398 tanto en el ámbito hospitalario como comunitario y ganadero (Silva *et al.*, 2023; Touaitia, Ibrahim, *et al.*, 2025)

1.2.10 Detección Molecular

1.2.10.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico constituye una fase crítica en estudios de caracterización molecular, ya que la calidad, pureza e integridad del material genético obtenido condicionan directamente la sensibilidad y confiabilidad de técnicas posteriores como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, este proceso representa un desafío adicional debido a la presencia de una pared celular gruesa rica en peptidoglicano, ácidos teicoicos y estructuras superficiales que dificultan la lisis celular eficiente (Chen & Yuan, 2023; Galeano *et al.*, 2025).

Uno de los métodos ampliamente utilizados en microbiología molecular es la extracción salina o método de precipitación con sales por Aljanabi & Martinez, (1997), caracterizado por su bajo costo, reproducibilidad y eficiencia para estudios de laboratorio convencionales. Este procedimiento suele incluir etapas de lisis celular mediante detergentes como SDS, digestión proteica con proteinasa K, precipitación proteica con soluciones salinas concentradas (NaCl o acetato), recuperación del ADN mediante alcoholes como isopropanol o etanol, y posterior re suspensión en buffer libre de nucleasas. Es un método universal, efectivo y reproducible para la extracción de ADN de alta calidad para aplicaciones basadas en PCR y su principal ventaja radica en la obtención de ADN de buena calidad sin necesidad de kits comerciales especializados (Umbrasko *et al.*, 2022)

Por otra parte, los kits comerciales basados en columnas de sílice o resinas de afinidad permiten procesos más estandarizados, rápidos y con menor variabilidad técnica, aunque su costo puede limitar su uso en ciertos contextos académicos o de investigación local. Ambos métodos pueden resultar adecuados, siempre que el ADN obtenido presente

concentración suficiente y ausencia de inhibidores para aplicaciones de PCR (**Lee *et al.*, 2023**)

1.2.10.2 Cuantificación y pureza del ADN

Una vez obtenido el ADN genómico, resulta indispensable evaluar tanto su concentración como su pureza para asegurar un rendimiento óptimo en procesos de amplificación molecular. La cuantificación suele realizarse mediante espectrofotometría UV, utilizando equipos como NanoDrop™, que permiten medir absorbancia a 260 nm para determinar concentración de ácidos nucleicos (**S. Gautam *et al.*, 2019**).

La pureza del ADN se evalúa principalmente a través de las relaciones de absorbancia:

A260/A280: indica contaminación proteica; valores cercanos a 1.8 sugieren ADN relativamente puro.

A260/A230: refleja posible contaminación con sales, fenoles o compuestos orgánicos; valores entre 2.0–2.2 son considerados óptimos.

Valores alterados pueden indicar presencia de inhibidores que interfieran con la actividad de la ADN polimerasa durante PCR, generando amplificaciones deficientes o falsos negativos. Por ello, esta fase resulta esencial para garantizar la confiabilidad de los resultados moleculares (**Chen & Yuan, 2023**).

1.2.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR constituye una de las herramientas fundamentales en biología molecular para la amplificación exponencial *in vitro* de secuencias específicas de ADN. Su principio se basa en la replicación enzimática dirigida por cebadores (primers) complementarios a regiones blanco, permitiendo detectar genes específicos incluso cuando se encuentran en concentraciones mínimas dentro de una muestra biológica (Zhu *et al.*, 2024).

Los componentes esenciales de una reacción PCR incluyen:

- **ADN molde:** secuencia genómica a amplificar
- **Primers (cebadores):** oligonucleótidos específicos que delimitan la región diana
- **dNTPs:** nucleótidos libres (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- **ADN polimerasa termoestable:** comúnmente Taq polimerasa
- **Buffer de reacción:** mantiene condiciones óptimas de pH e iones
- **MgCl₂:** cofactor esencial para actividad enzimática

La especificidad de la PCR depende en gran medida del diseño de primers, condiciones de anillamiento y calidad del ADN molde. En estudios dirigidos a genes de virulencia como *pvl* y *sec*, la correcta selección de secuencias iniciadoras permite identificar con alta sensibilidad la presencia o ausencia de dichos determinantes moleculares (Nadiya *et al.*, 2023).

1.2.10.4 Ciclos térmicos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se lleva a cabo mediante una serie de ciclos térmicos secuenciales controlados por un termociclador, diseñados para permitir la amplificación exponencial de una región específica del ADN. Cada ciclo comprende tres fases fundamentales: la desnaturalización inicial, generalmente entre 94–95 °C, donde las cadenas dobles de ADN se separan por ruptura de puentes de hidrógeno; el anillamiento o hibridación, cuya temperatura varía usualmente entre 50–65 °C dependiendo de la temperatura de fusión de los primers, permitiendo la unión específica de los cebadores a las secuencias complementarias del ADN molde; y la extensión o elongación, comúnmente a 72 °C, temperatura óptima para la actividad de la ADN polimerasa termoestable (como Taq polimerasa), que sintetiza nuevas cadenas complementarias a partir de los dNTPs disponibles. La repetición continua de estos ciclos, normalmente entre 25 y 40 veces, produce una amplificación exponencial del fragmento objetivo, cuya eficiencia depende directamente de la correcta optimización de temperaturas, tiempos de incubación, concentración de reactivos y especificidad de los cebadores, factores esenciales para minimizar amplificaciones inespecíficas o falsos negativos (**Nadiya *et al.*, 2023; Taher *et al.*, 2021**).

1.2.10.5. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica de separación molecular utilizada para visualizar productos amplificados según su tamaño molecular, el principio se basa en la migración de fragmentos de ADN, cargados negativamente por sus grupos fosfato, a través de una matriz porosa de agarosa bajo influencia de un campo eléctrico, desplazándose hacia el polo positivo. Fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente que fragmentos grandes, permitiendo estimar el tamaño del producto

mediante comparación con marcadores de peso molecular. Posteriormente, los geles son teñidos con agentes intercalantes como GelRed o SYBR Safe, y visualizados mediante transiluminadores UV o LED (**Yang *et al.*, 2025**)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar la presencia de los genes *pvl-1* y *sec* en aislados de SARM obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica.

1.3.2 Objetivos específicos

- Detectar el gen *pvl-1* en aislados de SARM mediante la técnica de PCR convencional.
- Identificar el gen *sec* en aislados de SARM empleando también PCR convencional.
- Describir los mecanismos de acción molecular que están asociados a estos genes de virulencia (*pvl-1* y *sec*), basándose en la evidencia científica actual.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del experimento

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, localizados en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, Ecuador. Esta zona se encuentra a una altitud aproximada de 2.882 metros sobre el nivel del mar, con coordenadas geográficas de latitud 1°22'08.7'' y longitud 78°36'23.8'' (**Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Cevallos, 2026**).

2.1.1. Condiciones ambientales del lugar de investigación

Tabla 3. *Características ambientales del cantón Cevallos, Tungurahua.*

Categoría	Descripción
Clima	Templado
Temperatura (°C)	14.6
Humedad relativa (%)	60-75
Precipitación (mm)	200-500

Nota: Meteorología del cantón Cevallos. *Obtenido de: (GAD Cevallos, 2026).*

2.1.2. Equipos y Materiales

2.1.3. Materiales biológico experimental

El presente estudio se reactivó 80 cepas selectas como de *Staphylococcus aureus* meticilino, lo cual fueron conservadas en el laboratorio de Biología Molecular de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2 Equipos

- Incubadora
- Vórtex
- Refrigeradora
- Balanza Analítica FC 2000
- Autoclave
- Basic PCR Taq
- Microcentrífuga
- Cámaras de electroforesis
- Transiluminador
- Termociclador

2.2.1. Materiales

- Mandil
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla
- Cofia
- Papel aluminio
- Placas Petri de plástico
- Vasos de precipitación

- Varilla de agitación
- Espátula
- Palillos de cultivo
- Tubos para PCR 0,2 ml
- Micropipetas
- Tubos Eppendorf
- Tubos volumen 15 ml
- Caja de almacenamiento para Eppendorf
- Gradilla
- Puntas azules, amarillas y blancas con filtro
- Mecheros bunsen
- Matraz Erlenmeyer
- Probeta
- Papel Kraft
- Portaobjetos
- Cubetas
- Jeringas
- Cinta testigo

2.2.2. Reactivos

- Agar Tripticasa de soya
- Agar manitol salado
- Infusión cerebro-corazón (TM MEDIA)
- Alcohol
- Agua destilada
- Marcador de peso molecular
- Buffer TAE
- Agarosa
- Green Taq master mix de 1000 reacciones

- Primers (forward y reverso)
- Sybr safe
- Aceite de inmersión
- Isopropanol
- SDS al 20%
- Proteinasa K al 20mg/ml
- NaCl 6M

2.2.3. Materiales extras

- Cuaderno
- Computadora
- Esféro
- Marcador permanente de punta fina
- Cinta adhesiva
- Cámara fotográfica
- Pegatinas

2.2.4. Material Biológico

- Cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

2.3. Tipo de investigación

La presente investigación es de carácter observacional, descriptiva y transversal por la razón que se utilizó técnicas moleculares para presenciar los genes *pvl-1* y *sec*.

2.4 Hipótesis

2.4.1 Hipótesis nula (H_0)

No existe presencia detectable de los genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente obtenidos de muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis subclínica.

2.4.2 Hipótesis alternativa (H_1)

Existe presencia detectable de uno o ambos genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente obtenidos de muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis subclínica.

2.5 Selección de muestra

Las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) empleadas en esta investigación se encuentran crió conservadas a -20 °C en los laboratorios de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. Estas muestras biológicas proceden de investigaciones previas desarrolladas en distintos cantones de la provincia de Tungurahua, específicamente Pelileo, Mocha, Tisaleo y Píllaro, donde se identificaron unidades de producción lechera y se ejecutaron procesos sistemáticos de muestreo enfocados en la detección de mastitis subclínica en bovinos. Los aislamientos de *S. aureus* obtenidos fueron posteriormente sometidos a pruebas de sensibilidad antimicrobiana, lo que permitió identificar cepas resistentes a antibióticos betalactámicos.

En el cantón Tisaleo, de una población bovina de 454 animales, se evaluaron 214 vacas, de las cuales 93 presentaron resultados positivos a la prueba de California Mastitis Test (CMT), obteniéndose 23 cepas confirmadas de *S. aureus* (Carrera Molina, 2026). En Mocha, con una población total de 670 bovinos, se analizaron 209 vacas, identificándose 160 animales positivos a CMT y recuperándose 26 aislamientos del microorganismo (Arguello Rodríguez, 2026)

Por otra parte, en Pelileo se trabajó con una población de 339 animales, muestreándose 217 vacas; de estas, 56 fueron positivas a CMT, permitiendo la identificación de 6 aislamientos confirmados de *S. aureus* (Toainga Cunalata, 2026) Finalmente, en Píllaro, cuya población correspondió a 4000 bovinos, se analizaron 541 vacas, detectándose 166 casos positivos a CMT y obteniéndose 30 aislamientos del patógeno (Muzo Moreta, 2026).

En total, se dispuso de 85 muestras positivas que constituyeron la base biológica para el desarrollo de la presente investigación molecular, las cuales fueron conservadas bajo

condiciones adecuadas para su utilización en análisis posteriores.

Figura 3. Datos de investigaciones previas sobre mastitis subclínica causada por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) en los cantones de Tisaleo, Mocha, Pelileo y Pillaro, provincia de Tungurahua.

Cantón	Población	Total vacas muestreo	Vacas Positivas CMT	matitis subclínica	Cuartos afectados	Hemolíticas	Fermentan manitol	Tinción Gram Staphylococcus+	Catalasa +	Coagulasa +	S.aureus
Tisaleo	454	214	93	20,5	141	51	29	37	34	23	24,7
Mocha	670	209	160	23,9	332	94	72	72	38	26	16,3
Pelileo	339	217	56	16,5	75	30	24	21	16	6	10,7
Pillaro	4000	541	166	4,2	272	99	67	47	43	30	18,1
Total	5463	1181	475	8,7	820	274	192	177	131	85	17,9

Nota: Distribución de los datos recopilados por los investigadores sobre la presencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en diferentes hatos lecheros de los cantones Tisaleo, Mocha, Pelileo y Pillaro, en la provincia de Tungurahua.

Obtenido de: (Arguello Rodríguez, 2026; Carrera Molina, 2026; Muzo Moreta, 2026; Toainga Cunalata, 2026).

2.6. Variables de respuesta

2.6.1. Variable independiente

- Cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM).

2.6.2. Variable dependiente

- Presencia de genes de virulencia pvl-1 y sec.

2.6 Diseño de la Investigación

El presente estudio se desarrolla bajo un diseño no experimental de carácter descriptivo, orientado a la identificación de la presencia o ausencia de los genes de virulencia *pvl-1* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica. La metodología se fundamenta en la detección cualitativa de estos determinantes genéticos mediante técnicas de biología molecular, específicamente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, sin contemplar análisis de expresión génica ni cuantificación de material genético. Este diseño permite establecer la presencia o ausencia de dos importantes marcadores de virulencia asociados con la patogenicidad de *S. aureus*, contribuyendo a la caracterización molecular de las cepas estudiadas y aportando información relevante sobre el perfil genético de virulencia de aislados de origen bovino.

2.7 Manejo del experimento

La presente investigación se desarrolló en tres fases experimentales.

- La primera fase consistió en la reactivación de **80 cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente**, previamente conservadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. Para ello, las cepas fueron sembradas en medios de cultivo específicos con el fin de obtener crecimiento bacteriano adecuado y colonias viables para los procedimientos posteriores.

- La segunda fase correspondió a la extracción de ADN genómico bacteriano a partir de las cepas reactivadas. Esta etapa permitió obtener el material genético necesario para la amplificación molecular de los genes de virulencia estudiados.
- La tercera fase consistió en la detección molecular de los genes *pvl-1* y *sec* mediante PCR convencional. Finalmente, los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia o ausencia de bandas correspondientes a los tamaños esperados para cada gen.

2.7.1. Preparación de Agar Tripticasa de soya

1. Esterilizar previamente los materiales a utilizar en la autoclave a 120°C
2. Pesar en la balanza 32 gramos de agar tripticasa de soya.
3. Colocar 32 gramos de agar TS en una botella de vidrio de borosilicato con 800 ml de agua destilada y agitar hasta que se disuelva totalmente.
4. Seguidamente llevar a la autoclave a temperatura de 120°C (el tiempo depende de la autoclave que se use)
5. Una vez que el tiempo de la autoclave se haya terminado se debe de plaquear junto a un mechero en placas Petri estériles.
6. Esperar hasta que se solidifique alrededor de 1 hora y dar la vuelta todas las placas.
7. Esperar 24 horas para el cultivo de las cepas.

2.7.2. Cultivo de *Staphylococcus aureus* en agar Trypticase de soya

1. Sacar las cepas de la nevera las cuales se conservan a -20°C y esperar que se descongele en el cuarto estéril.
2. Rotular las placas Petri de preferencia con marcador permanente
3. Alado del mechero remover bien los eppendorf y con la ayuda de un palillo estéril colocar una gota de cada cepa en las placas.
4. Esperar una hora para que la gota se seque bien poder y estriara en sentido de las manecillas de reloj. 5. Seguidamente voltear las placas, envolverle en papel aluminio y llevar a la incubadora a 37°C por 24 horas.

2.7.3 Cultivo de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado

1. Retirar las cepas previamente reactivadas en agar Trypticase de soya y verificar la presencia de colonias viables con morfología compatible con *Staphylococcus aureus*.
2. Rotular adecuadamente las placas Petri con agar manitol salado utilizando marcador permanente, identificando número de muestra, fecha y código correspondiente.
3. Trabajar en condiciones de asepsia cerca del mechero o dentro de cabina de bioseguridad, tomando una colonia bacteriana aislada mediante palillo o asa bacteriológica estéril.
4. Inocular la muestra sobre la superficie del agar manitol salado mediante técnica de estriado por agotamiento, con el fin de favorecer el aislamiento de colonias individuales.
5. Incubar las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 a 48 horas.
6. Posteriormente, evaluar el crecimiento bacteriano y la fermentación de manitol, considerando como resultado presuntivo positivo para *Staphylococcus aureus* la

presencia de colonias acompañadas de cambio de color del medio de rojo a amarillo, debido a la producción de ácido por fermentación del manitol.

7. Registrar las características macroscópicas observadas, incluyendo coloración, tamaño, morfología colonial y reacción del medio, para su posterior correlación con pruebas microbiológicas y moleculares complementarias.

2.7.4. Tinción de Gram

1. Sacar de la incubadora las placas cultivadas para que se ambiente en el cuarto estéril.
2. Lavar, desinfectar y rotular los portaobjetos.
3. Colocar una gota de agua estéril en el porta objeto.
4. Alado del mechero con la ayuda de un palillo estéril tomar una muestra de la cepa y homogenizar bien en la gota de agua destilada.
5. Esperar hasta que se seque bien la muestra.
6. Una vez seca la muestra se procede a colocar las tinciones y lavar con agua destilada.
7. Se inicia añadiendo cristal violeta a la muestra durante 1 min y lavar.
8. Seguidamente añadir Lugol por un minuto y volver a lavar.
9. Posteriormente añadir acetona durante 10 segundos y lavar.
10. Para finalizar añadir safranina por 1 minuto y lavar.
11. Dejar secar las muestras para observar en el microscopio.

12. Observar microscópicamente las muestras mediante tinción de Gram, identificando como compatibles con *Staphylococcus aureus* aquellas que presenten cocos Gram positivos agrupados en racimos de coloración violeta. De las 85 cepas evaluadas, se descartaron aquellas que presentaron contaminación o morfología incompatible, seleccionándose únicamente las muestras viables para el análisis posterior dando resultado a 80 muestras viables.

2.7.5. Extracción de ADN por Aljanabi y Martínez (1997)

1. En tubos de 15 ml estéril colocar Infusión Cerebro Corazón, cultivar y colocar en la incubadora a 37°C durante 24 horas.
2. Tras transcurrir el tiempo necesario centrifugar los tubos a 3000 rpm x 15 min.
3. Retirar el sobrenadante.
4. Diluir en 500 µl de Infusión Cerebro Corazón y seguidamente pasar a tubos Eppendorf.
5. Después agregar 40 µl de SDS al 20%
6. Añadir 8 µl de Proteinasa K al 20mg/ml.
7. Mezclar bien (Vortex).
8. Incubar a 65°C durante 2 horas o toda la noche.
9. Agregar 300 µl de solución NaCl 6M.
10. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
11. Centrifugar a 10,000g durante 30 minutos.
12. Después pasar el sobrenadante a tubos Eppendorf.

13. Colocar un volumen igual de isopropanol, mezclar bien y colocar los tubos a -20°C durante 1 hora o toda la noche.
14. Centrifugar a 10,000g durante 20 min.
15. Lavar con etanol al 70% (400 µl) y centrifugar a 13000rpm a 5 min.
16. Re - suspender en 300 µl de agua estéril.
17. Por último, se realizó la lectura correspondiente a la concentración del ADN mediante espectrofotometría, la cual se realizó las 41 muestras y todas las muestras mostraron la concentración adecuada para realizar PCR.

2.7.6 Amplificación molecular por PCR

El protocolo generalmente inicia con una desnaturalización inicial a 94–95 °C durante 3–5 minutos para separar completamente las cadenas de ADN, seguida de 30–35 ciclos compuestos por desnaturalización a 94–95 °C por 30 segundos, anillamiento de cebadores entre 55–60 °C durante 30–60 segundos (temperatura que puede variar según el punto de fusión de los primers y cuya optimización es esencial para evitar amplificaciones inespecíficas), y una extensión a 72 °C durante 30–60 segundos, considerada la temperatura óptima para la actividad de la Taq polimerasa (Tabla 4). Finalmente, se realiza una extensión terminal a 72 °C durante 5–10 minutos para completar productos parciales. En la detección del gen pvl, protocolos multiplex frecuentemente emplean temperaturas de annealing cercanas a 55 °C, mientras que para sec suelen oscilar entre 55–58 °C, dependiendo del diseño molecular y longitud del amplicón. Factores como la concentración de MgCl₂, pureza del ADN y especificidad de cebadores influyen directamente en la eficiencia de la reacción, por lo que la estandarización previa resulta fundamental (Tabla 5) (Taher *et al.*, 2021).

Tabla 4. *Primers y condiciones de PCR para amplificación de los genes de virulencia de Staphylococcus aureus pvl y sec*

Nombre del Primer	Gen	Secuencia	Condiciones de PCR	Amplicon (bp)	
SEC-1	sec	GACATAAAAGCTAGGAATTT	DI: 94 °C 2 min	257	(Taher <i>et al.</i> , 2021)
			D II: 94°C 45 s		
SEC-2		AAATCGGATTAACATTATCC	Ali: 55°C 2 min		
			Ex: 72°C 1 min		
			Ex. F: 72 °C 5 min		
luk-PV-1	pvl-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACA	DI: 94 °C 5 min	433	(Sadat <i>et al.</i> , 2022)
		TGATCCA	D II: 94 °C 2 min		
			Ali: 50 °C		
			Ex: 72 °C		
luk-PV-2		GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAG	Ex. F:		
		C			

Tabla 5. *Composición del Master Mix utilizado por muestra para la amplificación de cada gen mediante PCR*

Reactivo	Volumen (µl)
GreenTaq	12,5
Cebador forward (f)	1
Cebador reverse (R)	1
ADN	2
Agua libre de nucleasas	8.5
Volumen final	25

2.7.8 Electroforesis

Esta técnica se basa en la migración de fragmentos de ADN a través de una matriz de agarosa sometida a un campo eléctrico, donde los fragmentos más pequeños se desplazan con mayor rapidez que los de mayor tamaño, permitiendo su separación según peso molecular. Generalmente, para productos de PCR de tamaño moderado, se emplean concentraciones de agarosa entre 1–2 %, dependiendo de la resolución requerida; geles al 1.5–2 % suelen ser recomendados para fragmentos pequeños o medianos, como los asociados a genes de virulencia bacterianos. La corrida electroforética se desarrolla comúnmente en buffer TBE o TAE, aplicando voltajes aproximados de 80–120 V durante 30–60 minutos, aunque estas condiciones pueden ajustarse según tamaño del gel y longitud esperada de los amplicones. Posteriormente, los fragmentos son teñidos con agentes intercalantes como bromuro de etidio, GelRed o SYBR Safe, permitiendo su visualización bajo luz ultravioleta o sistemas de foto documentación. La presencia de bandas definidas en posiciones específicas, comparadas con un marcador de peso molecular, confirma la amplificación exitosa de los genes objetivo. Una correcta preparación del gel, control del voltaje y elección adecuada del agente colorante son esenciales para evitar distorsiones, bandas difusas o interpretaciones erróneas. En estudios moleculares de *S. aureus*, la electroforesis permite validar la detección de genes asociados con virulencia y resistencia, consolidándose como una herramienta clave en diagnóstico microbiológico, vigilancia epidemiológica y análisis genético de cepas provenientes de mastitis bovina (Umbra *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2025).

2.8 Descripción de mecanismos moleculares de virulencia

Para la descripción molecular de los mecanismos de acción, virulencia y relevancia biológica de los genes evaluados, se realizó además una revisión bibliográfica de literatura científica especializada. La búsqueda de información se efectuó en bases de datos académicas reconocidas como PubMed, Scopus, ScienceDirect, MCDI, entre otras páginas y sitios web de difusión científica, utilizando palabras clave relacionadas con *Staphylococcus aureus*, SARM, mastitis bovina, mastitis subclínica, resistencia antimicrobiana, gen *pvl*, gen *sec*, virulencia bacteriana, resistencia antimicrobiana, perfil genético *S. aureus* y PCR molecular. Se priorizaron artículos científicos, revisiones sistemáticas y documentos académicos publicados en los últimos años, seleccionando fuentes con mayor pertinencia temática, respaldo científico y relación directa con los objetivos de la investigación (Behzadi & Gajdács, 2021).

2.9 Recolección de la información

La información se obtuvo mediante la observación microbiológica de las cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente durante su reactivación en medios de cultivo selectivos, complementada con la detección molecular de los genes *pvl-I* y *sec* mediante la técnica de PCR convencional. Los resultados fueron registrados de forma binaria, estableciendo para cada cepa la presencia o ausencia de amplificación genética según la visualización de bandas específicas en gel de agarosa (Silveira *et al.*, 2022).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección y clasificación de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aisladas de leche con mastitis subclínica

El proceso experimental inició con la reactivación de cepas previamente conservadas de *Staphylococcus aureus* almacenadas a -20 °C, con el propósito de recuperar su viabilidad bacteriana para posteriores análisis moleculares. Para ello, los aislamientos fueron inicialmente sembrados en agar manitol salado, un medio selectivo y diferencial utilizado para favorecer el crecimiento de estafilococos y evaluar su capacidad de fermentación de manitol. Posteriormente, las colonias desarrolladas fueron cultivadas en agar tripticasa de soya con el fin de obtener cultivos puros y viables, la confirmación fenotípica se realizó mediante tinción de Gram, observándose cocos Gram positivos agrupados en racimos, característica morfológica compatible con *Staphylococcus aureus*, este procedimiento se ejecutó de manera progresiva en lotes de 24 muestras hasta completar el procesamiento de las 85 cepas seleccionadas para la investigación.

Como resultado, se logró la recuperación exitosa de 80 cepas bacterianas, mientras que 5 aislamientos fueron descartados debido a contaminación durante el procedimiento, alcanzando una tasa de reactivación aproximada del 94 % (Tabla 6). Este porcentaje evidencia que las condiciones de conservación, cultivo y manipulación fueron en general adecuadas para preservar la viabilidad de los microorganismos. La pérdida parcial de muestras es un evento esperado en estudios que emplean cepas crio conservadas, debido a que factores como el tiempo de almacenamiento, la supervivencia celular post-

congelación, la composición de los medios de cultivo y la manipulación microbiológica pueden influir directamente en la recuperación final. En investigaciones microbiológicas y de biología molecular, se consideran aceptables pérdidas de entre 5–10 % en muestras previamente preservadas por congelación y sometidas posteriormente a procesos de reactivación (FAO, 2025).

Tabla 6. *Análisis de la cantidad de muestras de cepas de Staphylococcus aureus meticilino resistente recuperadas de congelación para el desarrollo de la investigación*

Cantón	Número de muestras preservadas en congelación	Número final de muestras recuperadas
Tisaleo	23	21
Mocha	26	23
Pelileo	6	6
Píllaro	30	30
Muestras totales	85	80

Nota: Las muestras descartadas por contaminación corresponden los cantones de Tisaleo y Mocha, donde en el primero se perdieron 2 muestras, y en el segundo 3 muestras.

La reducción en la viabilidad de los aislados tras el proceso de crioconservación, que resultó en la pérdida de 5 muestras (6% del total), puede atribuirse a la formación de microcristales de hielo intracelulares y al choque osmótico derivado de las fluctuaciones térmicas durante el almacenamiento. Autores como **Pérez *et al.*, (2020)** mencionan que la manipulación de grandes volúmenes de aislados de mastitis bovina aumenta el riesgo

de variabilidad en la recuperación tras la congelación. Asimismo, la sensibilidad de *S. aureus* a los ciclos de descongelación compromete la integridad de la membrana celular, un fenómeno que, según **Shahzad et al., (2024)**, es determinante cuando se trabaja con cepas recolectadas en campo que han estado expuestas a condiciones de estrés ambiental previo al procesamiento en laboratorio

La presencia de contaminación en ciertas placas de cultivo, aun bajo estrictas condiciones de asepsia, sugiere la influencia de la carga microbiana intrínseca y competitiva de la muestra original. Como señalan **Dehkordi et al., (2024)**, la leche cruda y los productos lácteos presentan una microbiota amplia donde otros microorganismos pueden superar el crecimiento de *S. aureus* incluso en medios selectivos. Este fenómeno de competencia microbiana es respaldado por la revisión sistemática de **González-Machado et al., (2024)**, quienes indican que la microbiota acompañante en muestras de origen lácteo puede interferir significativamente en el aislamiento de patógenos específicos, especialmente cuando las bacterias ambientales aprovechan los nutrientes del medio con mayor eficiencia metabólica.

No obstante, la identificación de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) basándose estrictamente en características fenotípicas como fermentación a manitol y posteriormente la resistencia a penicilinas, cefoxitina u oxacilina mediante la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer), es un enfoque metodológico sólido y validado internacionalmente. Autores como **Lakhundi & Zhang, (2018)** subrayan que la expresión fenotípica de la resistencia es el indicador clínico definitivo de la funcionalidad de la proteína PBP2a, independientemente de la carga genética. Asimismo, la ausencia de genes como *mecA* en algunos aislados fenotípicamente resistentes no invalida la identificación de las cepas como SARM, ya que, como indican **González-Machado et al., (2024)** la resistencia puede estar mediada por mecanismos alternativos como los homólogos *mecC* o *mecB*, o por la hiperproducción de betalactamasas (BORSA), los cuales son detectables únicamente mediante pruebas de susceptibilidad fenotípica.

3.2 Ausencia del gen *pvl-1* en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aisladas de leche con mastitis subclínica

En el presente estudio, la ausencia total del gen de la leucocidina de Pantón-Valentine (*pvl*) (Figura 3), en los aislados analizados coincide con diversos reportes regionales y globales anteriormente mencionados en la tabla 1, que sugieren que este factor de virulencia no es un componente ubicuo en todas las poblaciones de *Staphylococcus aureus*, especialmente en aquellas vinculadas al sector ganadero.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la visualización del gen *pvl-1* en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.



Durante la estandarización del protocolo de PCR, se determinó que la temperatura de anillamiento (T_a) era el parámetro más crítico para garantizar la especificidad de la reacción, debido a que las temperaturas teóricas de *melting* (T_m) provistas por los diseñadores son guías iniciales que fluctúan en la práctica según las condiciones iónicas del buffer y el contenido de GC de los oligonucleótidos. Por esta razón, se realizaron modificaciones dinámicas en la T_a (Tabla 7) mediante ensayos en gradiente térmico, buscando el equilibrio óptimo entre la especificidad y el rendimiento, y evitando así la

formación de dímeros de cebadores o uniones inespecíficas que sesgaran la interpretación. A pesar de estas optimizaciones rigurosas, la ausencia de amplificación y la consecuente falta de muestras positivas en los ensayos finales no representan un fallo metodológico o un error operativo. Por el contrario, la obtención de resultados negativos, bajo condiciones experimentales minuciosamente controladas y validadas, constituye un hallazgo concluyente que demuestra la alta especificidad del ensayo y confirma de manera fidedigna la ausencia del fragmento diana en las muestras analizadas, descartando la existencia de falsos positivos inducidos por artefactos de la reacción (**Kralik & Ricchi, 2017; Umbrasko *et al.*, 2022**)

Tabla 7. Resultados de ensayos PCR para la amplificación del gen *pvl-1* en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Ensayo	Temperatura de anillamiento utilizada	Amplificación esperada	Resultado global	Observaciones
1° intento	55 ° C	433 bp	0/80 positivos	No se observó amplificación específica; se ajustó cantidad de ADN.
2° intento	57 °C	433 bp	0/80 positivos	Persistió ausencia de bandas específicas.
3° intento	59 °C	433 bp	0/80 positivos	No se obtuvo amplificación específica.
4° intento	60 °C	433 bp	0/80 positivos	Condiciones finales evaluadas.

La ausencia de los genes *lukS-PV/lukF-PV* (*pvl-1*) en los aislados analizados en la presente investigación podría explicarse por la propia dinámica evolutiva y epidemiológica de este determinante de virulencia. A diferencia de otros factores codificados de forma estable en el cromosoma bacteriano, el operón *luk-PV* se localiza en bacteriófagos temperados de la familia *Siphoviridae*, principalmente en variantes del fago Sa2, lo que le confiere una

elevada movilidad genética y una marcada inestabilidad dentro del genoma de *Staphylococcus aureus*. Debido a ello, la presencia de *PVL* depende directamente de la integración o pérdida del profago correspondiente, fenómeno que puede ocurrir mediante eventos de transducción, recombinación o escisión fágica durante el ciclo lítico bacteriano. Esta naturaleza móvil explicaría por qué la distribución de *PVL* presenta una elevada variabilidad entre linajes clonales, hospedadores y contextos epidemiológicos (Algammal *et al.*, 2020; Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025)

Esto supone que la presencia de PVL depende de eventos de transferencia horizontal y de la capacidad de la cepa para adquirir y conservar el profago portador. En consecuencia, la distribución de este determinante de virulencia suele ser heterogénea entre linajes de *Staphylococcus aureus* y no constituye un componente esencial del genoma de la especie. Coombs *et al.*, (2020) describieron una amplia diversidad de fagos portadores de PVL y demostraron que estos elementos presentan patrones variables de distribución entre cepas geográfica y temporalmente relacionadas, lo que evidencia que la presencia de PVL está condicionada por la dinámica evolutiva de los elementos móviles más que por la pertenencia a una determinada especie bacteriana. Anteriormente, Turchi *et al.*, (2024) caracterizaron un bacteriófago portador de PVL aislado de leche cruda y demostraron la existencia de variantes naturales que habían perdido la región que contenía los genes de PVL debido a eventos de recombinación genética, sugiriendo que la ausencia de *pvl-I* puede estar asociada tanto a la falta de adquisición del fago correspondiente como a la pérdida posterior de este elemento durante la evolución de los aislados bacterianos.

Estudios previos descritos en la Tabla 1 han demostrado que *PVL* se encuentra principalmente asociado a clones de *community-acquired MRSA* (CA-MRSA), como ST8 (USA300), ST80 o ST59, los cuales poseen una mayor carga de elementos genéticos móviles relacionados con virulencia y adaptación comunitaria. En contraste, los linajes asociados a producción animal (*livestock-associated MRSA*, LA-MRSA), especialmente aquellos pertenecientes a complejos clonales como CC398, CC97, CC151 o CC705, generalmente carecen de los genes *lukS-PV/lukF-PV*. Este patrón coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde no se detectó el gen *pvl-I* en ninguno de los aislados bovinos analizados e igualmente con investigaciones realizadas en China e India que destacan por su producción lechera han reportado resultados similares en cepas provenientes de mastitis bovina, sugiriendo que la ausencia de *PVL* podría representar una característica adaptativa frecuente de linajes asociados al ganado (Fetsch *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023)

Se ha mostrado que ciertos clones presentan una frecuencia extremadamente baja de PVL en comparación con los SARM comunitarios humanos. Lienen *et al.*, (2021) caracterizaron aislados de SARM provenientes de mastitis bovina y observaron que todos eran negativos para PVL, mientras que Tegegne *et al.*, (2021) reportaron resultados similares en aislados obtenidos de leche de tanque. En ambos estudios predominaban linajes relacionados con ST398, considerado uno de los principales clones ganaderos a nivel mundial. Adicionalmente, análisis genómicos revelaron que los aislamientos ST398 asociados a ganado carecen de múltiples genes de virulencia transportados por fagos, incluyendo PVL, lo que sugiere una trayectoria evolutiva diferente a la observada en clones comunitarios humanos. Esta tendencia indica que la adaptación al hospedero animal puede haber favorecido la pérdida o la no adquisición de determinados elementos móviles, conservando únicamente aquellos que ofrecen ventajas para la supervivencia y transmisión en poblaciones ganaderas (Fernandez *et al.*, 2024).

Desde el punto de vista biológico, esta ausencia también podría relacionarse con la especificidad de hospedero de ciertas leucotoxinas estafilocócicas, mientras que PVL presenta mayor afinidad por receptores presentes en leucocitos humanos, como C5aR/CD88, cepas bovinas suelen portar otras citotoxinas más adaptadas a rumiantes, como LukM/LukF-PV, las cuales muestran mayor actividad sobre neutrófilos bovinos. Esto indicaría que, en mastitis bovina subclínica, la persistencia bacteriana no necesariamente depende de PVL, sino de otros mecanismos de adaptación, invasión intracelular, formación de biopelículas y evasión inmune específicos del hospedador bovino (Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025).

Sobre la base de estos criterios, se relaciona la ausencia de *pvl-1* con la adaptación evolutiva de determinados linajes de *Staphylococcus aureus* al hospedero bovino, pues se ha demostrado que las cepas asociadas a mastitis bovina suelen presentar perfiles genéticos diferentes a los observados en cepas humanas, especialmente aquellas responsables de infecciones cutáneas invasivas donde *pvl-1* desempeña un papel importante. En la producción lechera predominan linajes adaptados al ganado, cuya capacidad de persistencia parece depender más de mecanismos de adhesión, colonización y supervivencia intramamaria que de toxinas citolíticas altamente agresivas. Johler *et al.*, (2018) analizaron aislados recuperados durante la elaboración de quesos artesanales elaborados con leche cruda y no detectaron el gen *pvl-1*, observando además la predominancia de genotipos vinculados históricamente a mastitis bovina. De manera similar, Jung & Lee, (2022) identificaron 93 aislados de *Staphylococcus aureus* en leche de tanque de enfriamiento de granjas lecheras coreanas y no detectaron el gen *pvl* en ninguno de ellos; sin embargo, reportaron alta prevalencia de genes de adhesión celular (*fnbA*, *clfA*, *clfB*) y del operón de biopelícula (*icaA*, *icaD*), confirmando que los linajes adaptados al ambiente mamario bovino dependen de mecanismos de adhesión y colonización en lugar de toxinas citolíticas como PVL. En conjunto, esto sugiere que la adaptación al ambiente mamario bovino favorece la conservación de factores involucrados en colonización persistente y mantenimiento de la infección, mientras que toxinas como PVL podrían no representar una ventaja biológica significativa dentro de

este nicho ecológico especializado.

Así pues, la ausencia de *PVL* no excluye completamente la posibilidad de una adquisición futura del operón. Estudios filogenéticos han identificado variantes clonales *PVL*-negativas que conservan remanentes del profago Sa2 dentro de su genoma, lo que sugiere pérdidas secundarias del gen tras eventos de escisión incompleta, estos remanentes pueden actuar posteriormente como sitios de recombinación para nuevas integraciones fágicas. En consecuencia, la ausencia actual de *pvl-1* en los aislados estudiados no necesariamente representa una condición evolutivamente irreversible, sino un perfil genético dinámico susceptible de modificaciones mediante transferencia horizontal (**Liu et al., 2023; Rocha et al., 2019**).

Adicionalmente, la baja frecuencia de *PVL* en cepas bovinas resulta coherente con el comportamiento epidemiológico descrito para este determinante de virulencia. Diversos estudios reportan prevalencias extremadamente bajas de *PVL* en cepas comensales o portadoras asintomáticas, mientras que su presencia aumenta considerablemente en infecciones invasivas humanas, neumonías necrotizantes e infecciones cutáneas severas. Esto sugiere que *PVL* otorga ventajas selectivas principalmente en contextos de infección aguda y transmisión epidémica humana, pero no constituye un factor indispensable para la colonización persistente o la mastitis subclínica bovina. Por ello, los resultados obtenidos en esta investigación podrían indicar que las cepas circulantes en los sistemas lecheros estudiados presentan perfiles moleculares más orientados hacia persistencia crónica y adaptación al hospedador bovino que relacionada virulencia citotóxica aguda asociada a clones epidémicos humanos (**Raghuram et al., 2024; Tenezaca Lliguin et al., 2025; Touaitia, Mairi, et al., 2025**).

3.3 Ausencia del gen *sec* en cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes aisladas de leche con mastitis subclínica

En la presente investigación no se detectó amplificación del gen *sec* en ninguno de los aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente analizados (Figura 4), lo que indica que este determinante molecular de enterotoxigenicidad no forma parte del perfil genético de las cepas evaluadas en bovinos con mastitis subclínica en los cantones evaluados en Tungurahua. Aunque el gen *sec*, responsable de codificar la enterotoxina estafilocócica tipo C, ha sido considerado un marcador relevante por su asociación con procesos inflamatorios persistentes y riesgos de intoxicación alimentaria en productos lácteos, su distribución en poblaciones bovinas de *S. aureus* no es uniforme y puede variar considerablemente según factores geográficos, clonalidad bacteriana y presión epidemiológica regional.

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para la visualización del gen *sec* en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.



Con respecto a la detección molecular del gen *sec*, la temperatura de anillamiento Ta fue modificada y ajustada de forma metódica mediante un gradiente térmico, alejándose de la temperatura de *melting* (Tm) teórica de los cebadores. Esta modificación fue técnicamente necesaria debido a que la estabilidad del dúplex cebador-molde varía en la práctica según las condiciones del ensayo, y se requería maximizar la especificidad para evitar uniones erróneas o dímeros de *primers* que compitieran por la reacción. A pesar de estas optimizaciones rigurosas en las condiciones de ciclación mostradas en la tabla 8, no se observaron bandas de amplificación correspondientes al tamaño esperado para el gen *sec*, resultando el 100% de las muestras analizadas como negativas. Este escenario no debe interpretarse como un fallo metodológico o una deficiencia en la sensibilidad del ensayo, puesto que el uso de los controles y la calibración estricta de la Ta garantizan la fidelidad del proceso. Por lo tanto, la ausencia de señales positivas constituye un hallazgo epidemiológico real y concluyente, que demuestra que las cepas evaluadas carecen del determinante genético para la enterotoxina C, descartando este factor de virulencia específico en la población muestreada (Nadiya *et al.*, 2023).

Tabla 8. Resultados de ensayos PCR para la amplificación del gen *sec* en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Ensayo	Temperatura de anillamiento utilizada	Amplificación esperada	Resultado global	Observaciones
1° intento	50 °C	257 bp	0/80 positivos	Se cambió la polimerasa utilizada para optimizar sensibilidad
2° intento	55 °C	257 bp	0/80 positivos	Persistió ausencia de amplificación; se mantuvieron ajustes en polimerasa y concentración de ADN.
3° intento	56 °C	257 bp	0/80 positivos	No se detectaron bandas específicas.
4° intento	63 °C	257 bp	0/80 positivos	Condiciones finales evaluadas sin resultados positivos.

La ausencia del gen *sec* en los aislados analizados en la presente investigación podría explicarse por la distribución clonal y la dinámica genética característica de las cepas bovinas de *Staphylococcus aureus*. A diferencia del operón *pvl*, localizado principalmente en bacteriófagos temperados, el gen *sec* suele encontrarse dentro de islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPIs), particularmente en la isla *SaPI_{bov}*, asociada con determinados linajes bovinos como CC133 y CC151. Debido a ello, la presencia de esta enterotoxina depende directamente de que la cepa haya adquirido o conservado dicha isla genética, mientras que otros complejos clonales ampliamente distribuidos en mastitis bovina, como CC97, CC1 y CC705, generalmente no portan *SaPI_{bov}*. Esto podría explicar por qué no se detectó el gen *sec* en los aislados evaluados, sugiriendo que las cepas circulantes en los sistemas lecheros estudiados pertenecen probablemente a linajes con repertorios de virulencia distintos (Campos *et al.*, 2022; Rocha *et al.*, 2019; Touaitia, Ibrahim, *et al.*, 2025).

Estudios de genómica comparativa realizados en cepas bovinas han demostrado que el perfil de enterotoxinas varía considerablemente entre clones y tipos de mastitis Tabla 1. Rocha *et al.*, (2019) reportaron que el gen *sec-bov* estuvo ausente en todas las cepas asociadas a mastitis subclínica analizadas, mientras que sí fue identificado en la cepa clínica RF122, reconocida por su elevada virulencia y capacidad de producir daño mamario severo. Este hallazgo coincide con los resultados obtenidos en la presente investigación y sugiere que la ausencia de *sec* podría estar relacionada con estrategias de persistencia subclínica más que con mecanismos de inflamación aguda. En este sentido, las cepas responsables de mastitis subclínica tienden a favorecer características como invasión intracelular, formación de biopelículas y baja citotoxicidad, permitiendo una colonización prolongada de la glándula mamaria sin desencadenar respuestas inflamatorias intensas fácilmente detectables.

Desde el punto de vista molecular, SEC actúa como un superantígeno capaz de inducir una activación masiva e inespecífica de linfocitos T, promoviendo la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-2, IL-6 e IFN- γ . Diversos modelos experimentales han demostrado que esta enterotoxina puede generar infiltración inflamatoria severa y daño tisular en la glándula mamaria. Por ello, la ausencia de *sec* en las cepas estudiadas podría indicar un menor potencial inflamatorio asociado a los aislados analizados, lo cual resulta compatible con la naturaleza subclínica de las infecciones evaluadas. En consecuencia, esto podría reflejar la circulación de cepas adaptadas a una estrategia de persistencia silenciosa dentro del hospedador bovino, más orientada al mantenimiento intracelular y la evasión inmune que a la inducción de cuadros clínicos agudos (**Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025**).

La marcada variabilidad geográfica reportada para las enterotoxinas estafilocócicas en aislados bovinos, vista por las investigaciones realizadas en Egipto, China y Bangladesh han demostrado prevalencias muy heterogéneas de *sec*, con porcentajes bajos o incluso ausencia total en ciertos contextos epidemiológicos. Por ello, se plantea que esta diversidad puede estar influenciada por diferencias regionales en los linajes circulantes, manejo productivo, presión antimicrobiana y condiciones ambientales, por lo tanto, la ausencia de *sec* no debe interpretarse como un hallazgo aislado, sino como parte de la amplia heterogeneidad genética descrita mundialmente para *S. aureus* bovino (**Islam *et al.*, 2025; Liu *et al.*, 2023**)

De esta forma, su ausencia no implica necesariamente una pérdida total del potencial enterotoxigénico de las cepas estudiadas. Diversos autores han señalado que otras enterotoxinas y superantígenos pueden desempeñar funciones biológicas similares dentro de ciertos linajes bovinos. Por ejemplo, cepas pertenecientes a CC1 suelen portar *seh*, mientras que otros complejos clonales presentan genes como *seg* y *sei*, los cuales también participan en la modulación inmune y la persistencia bacteriana. Esto sugiere que los mecanismos de virulencia en *S. aureus* bovino son altamente redundantes y adaptativos,

permitiendo que diferentes repertorios genéticos cumplan funciones equivalentes dependiendo del contexto ecológico y del hospedador, y lo observado en este estudio podría representar una característica propia de los linajes circulantes en la región analizada, sin excluir la participación de otros determinantes de virulencia no evaluados (Arias, 2024; Fang *et al.*, 2019; Shalaby *et al.*, 2024; Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025).

3.5 Mecanismos de acción molecular de virulencia asociados a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

La relación entre los marcadores moleculares de virulencia y la resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) ha sido ampliamente investigada; sin embargo, la evidencia disponible sugiere que esta interacción es compleja y dependiente del contexto epidemiológico y genético de las poblaciones bacterianas analizadas. En este sentido, estudios como el de Pérez *et al.*, (2020) no identificaron asociaciones estadísticamente significativas entre los genes de virulencia y los determinantes genéticos de resistencia en aislados de mastitis bovina, lo que indica que la presencia de ambos grupos de genes podría obedecer a procesos evolutivos independientes. Los autores atribuyeron parcialmente estos hallazgos a la baja prevalencia de algunos marcadores evaluados, situación que limita el poder estadístico para detectar correlaciones biológicamente relevantes, estos resultados sugieren que la sola coexistencia de genes de virulencia y resistencia no constituye evidencia suficiente para inferir una relación funcional directa, especialmente en poblaciones donde la frecuencia de dichos determinantes es reducida.

No obstante, otros estudios han reportado una distribución diferencial de determinados factores de virulencia entre cepas SARM y MSSA, lo que evidencia que la asociación puede variar según el linaje clonal predominante y las presiones selectivas presentes en cada ecosistema. Shahzad *et al.*, (2024) observaron una mayor frecuencia de los genes de adhesión *clfA* y *clfB*, así como de la leucocidina de Panton-Valentine (*lukPV*), en

aislados SARM procedentes de mastitis bovina, lo que podría conferir ventajas adaptativas relacionadas con la colonización, persistencia tisular y evasión de la respuesta inmune del hospedador. Asimismo, **Silva *et al.*, (2023)** documentaron la presencia simultánea de múltiples genes de virulencia y perfiles de multirresistencia en linajes específicos de SARM asociados a animales de producción, mientras que **Tenezaca Lliguin *et al.*, (2025)** reportaron una elevada frecuencia de genes hemolíticos y toxigénicos en aislados portadores de *mecA* obtenidos en Ecuador. En conjunto, estos hallazgos sugieren que ciertos clones epidémicos pueden acumular determinantes genéticos que favorecen simultáneamente la supervivencia frente a los antimicrobianos y el establecimiento exitoso de la infección.

Desde una perspectiva molecular, la interacción entre virulencia y resistencia parece estar influenciada por mecanismos de coevolución genética y regulación coordinada de la expresión génica. **Patel & Rawat, (2023)** describieron que los sistemas reguladores *agr* y *sae* participan en la modulación dinámica de factores asociados con la formación de biopelículas y la producción de toxinas, permitiendo a la bacteria adaptar su comportamiento fisiológico a las distintas etapas del proceso infeccioso. Paralelamente, elementos genéticos móviles como el SCCmec, las islas de patogenicidad estafilocócicas (SaPI) y otros elementos transferibles constituyen plataformas eficientes para la adquisición y dispersión horizontal de genes relacionados con resistencia, adaptación y virulencia. Por consiguiente, aunque la evidencia epidemiológica no demuestra de manera consistente una asociación estadística entre ambos grupos de marcadores, los mecanismos genéticos y regulatorios descritos respaldan la existencia de una relación biológica potencialmente relevante, esto sugiere que la emergencia y persistencia de determinados clones de SARM podría ser el resultado de procesos de selección que favorecen la coexistencia de características asociadas tanto a la resistencia antimicrobiana como al potencial patogénico (**Larsen *et al.*, 2022**).

Por otro lado, como mecanismos alternos de virulencia que se pueden relacionar con MDR en *Staphylococcus aureus* se encuentra la formación de biopelículas, como tal, este es uno de mecanismos más relevantes en la cronificación de las infecciones intramamarias. Genes como *icaA*, *icaD* y *bap* participan en la síntesis de polisacáridos extracelulares y estructuras biofilm que protegen a la bacteria frente a la penetración de antimicrobianos y la acción fagocítica. Diversos autores han señalado que las cepas responsables de infecciones persistentes presentan mayor producción de biofilm Tabla 1, y una menor expresión de toxinas agudas, fenómeno regulado parcialmente por sistemas como *agr*. Este equilibrio entre adhesión, persistencia y baja citotoxicidad permitiría a las cepas mantenerse durante largos periodos dentro del hospedador sin desencadenar cuadros clínicos severos, dificultando su detección temprana y favoreciendo su diseminación silenciosa (Brdová *et al.*, 2024).

Las hemolisinas α y β , codificadas por *hla* y *hlb*, respectivamente, también forman parte de este grupo, estas toxinas poseen capacidad citolítica sobre células epiteliales mamarias y eritrocitos, favoreciendo daño tisular, necrosis y liberación de nutrientes esenciales para la bacteria, como hierro. Modelos experimentales han demostrado que cepas deficientes en *hla* generan inflamación considerablemente menor y son eliminadas más fácilmente por el hospedador, lo que confirma su papel central en la patogenia de la mastitis bovina. Por ello, se establece que la presencia de hemolisinas podría contribuir a mantener procesos inflamatorios crónicos de baja intensidad que garantizan la viabilidad a largo plazo de la bacteria (Liu *et al.*, 2023; Touaitia, Mairi, *et al.*, 2025).

Otro factor de gran importancia en cepas bovinas es la leucocidina LukMF, considerada actualmente la principal leucotoxina asociada a mastitis en rumiantes. A diferencia de *PVL*, cuya actividad está dirigida principalmente hacia leucocitos humanos, LukMF presenta elevada afinidad por el receptor CCR1 presente en neutrófilos bovinos, mostrando una citotoxicidad significativamente mayor sobre células inmunes de rumiantes. Estudios genómicos han reportado una alta prevalencia de *lukM* en linajes

bovinos ampliamente distribuidos como CC97, lo que sugiere que la ausencia de *PVL* podría reflejar una adaptación específica al hospedador bovino, donde otras leucocidinas cumplen funciones equivalentes o incluso más eficientes dentro de la glándula mamaria (**Campos *et al.*, 2022**).

Asimismo, las adhesinas bacterianas pertenecientes al grupo MSCRAMMs, como *clfA*, *clfB*, *fnbA* y *fnbB*, desempeñan un papel fundamental en la persistencia de *S. aureus* durante la mastitis subclínica. Estas proteínas facilitan la unión a fibrinógeno, fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular mamaria, promoviendo la internalización bacteriana dentro de células epiteliales. La capacidad de invasión intracelular genera reservorios protegidos frente a la acción de antibióticos β -lactámicos y de la respuesta inmune, favoreciendo infecciones recurrentes y de difícil erradicación (**Campos *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023; Touaitia, Ibrahim, *et al.*, 2025**) Desde esta perspectiva, la persistencia observada en mastitis subclínica podría depender más de mecanismos de adhesión e invasión que de toxinas altamente citolíticas como *PVL* o *SEC*.

3.6 Verificación de hipótesis

Los resultados obtenidos mediante PCR no evidenciaron la presencia de los genes de virulencia *pvl-I* ni *sec* en ninguno de los aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente analizados, provenientes de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica. La ausencia de amplificación de ambos genes en la totalidad de las cepas evaluadas indica que, bajo las condiciones metodológicas empleadas, no se detectó la presencia de estos determinantes de virulencia en la población estudiada.

En función de estos hallazgos, se acepta la hipótesis nula (H_0), la cual establece que no existe presencia detectable de los genes de virulencia *pvl-I* y *sec* en aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente obtenidos de muestras de leche provenientes de bovinos con mastitis subclínica. Consecuentemente, se rechaza la hipótesis alternativa (H_1), que planteaba la presencia detectable de uno o ambos genes en los aislados.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La caracterización molecular de los aislados de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM) obtenidos de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica en la provincia de Tungurahua demostró una prevalencia del 0% para los genes de virulencia *pvl-1* y *sec*. Este resultado indica que las cepas circulantes en la población estudiada no portan estos dos determinantes genéticos, lo cual difiere de lo reportado en otras regiones donde *sec* y *pvl* alcanzan frecuencias significativas en aislados de origen bovino.
- La ausencia de amplificación del gen *pvl-1* en todos los aislados analizados indica que las cepas estudiadas no poseen este determinante genético asociado a la producción de la leucocidina de Panton-Valentine, una toxina relacionada con daño leucocitario y procesos inflamatorios severos. Estos resultados coinciden con reportes que señalan una distribución variable de este gen según el origen geográfico, el hospedador y el linaje bacteriano.
- Del mismo modo, no se detectó la presencia del gen *sec* en ninguno de los aislados evaluados, evidenciando la ausencia de este determinante asociado a la producción de la enterotoxina C estafilocócica. Esto establece que las cepas analizadas no presentan este factor de virulencia específico, frecuentemente relacionado con mecanismos de superantigenicidad y con eventos de intoxicación alimentaria.

- A pesar de la ausencia de *pvl-1* y *sec*, la literatura revisada evidencia que la virulencia y la resistencia antimicrobiana en *S. aureus* están estrechamente vinculadas mediante mecanismos como la transferencia horizontal de genes a través de elementos genéticos móviles, lo cual refuerza la importancia de continuar la caracterización molecular de aislados de SARM en sistemas lecheros para identificar otros determinantes de virulencia que puedan estar presentes en las cepas MDR circulantes.

Recomendaciones

- Se recomienda desarrollar investigaciones complementarias orientadas a la detección de otros genes de virulencia y resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus* metilino-resistente, incluyendo marcadores asociados a formación de biopelículas, adhesión bacteriana, hemolisinas y sistemas regulatorios, con el fin de ampliar la comprensión de su potencial patogénico en mastitis bovina subclínica.
- Fortalecer programas de vigilancia molecular y epidemiológica en sistemas de producción lechera, orientados al monitoreo continuo de cepas resistentes y sus factores de virulencia, bajo un enfoque integral de salud animal, salud pública e inocuidad alimentaria.
- Promover prácticas adecuadas de bioseguridad, higiene de ordeño y uso racional de antimicrobianos en explotaciones bovinas, con el propósito de disminuir la persistencia y diseminación de cepas resistentes dentro de los sistemas productivos.
- Considerar estudios comparativos regionales y nacionales que permitan establecer patrones epidemiológicos más amplios sobre la distribución genética de *Staphylococcus aureus* en bovinos lecheros, fortaleciendo estrategias de prevención, diagnóstico y control sanitario.

BIBLIOGRAFIA

- Algammal, A. M., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D. H. H., Hozzein, W. N., Batiha, G. E. S., Nahhas, N. El, & Mabrok, M. A. (2020). Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3255–3265. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>
- Ali, T., Kamran, Raziq, A., Wazir, I., Ullah, R., Shah, P., Ali, M. I., Han, B., & Liu, G. (2021). Prevalence of Mastitis Pathogens and Antimicrobial Susceptibility of Isolates From Cattle and Buffaloes in Northwest of Pakistan. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 746755. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.746755/TEXT>
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.22.4692>
- Arguello Rodríguez, D. N. (2026). “*Detección de la prevalencia de Staphylococcus aureus resistente a meticilina a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica en haciendas del cantón Mocha.*” <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/c8e9b3ab-ea84-4295-84b3-29a32a2094a6/content>

- Arias, J. B. A. de. (2024). Gen SEA de la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* en queso fresco. *Crea Ciencia*, 17(2), e754–e754. <https://doi.org/10.69789/CC.V17I2.754>
- Balarezo Carvajal, A. J. (2025). “Identificación de genes de resistencia de *Staphylococcus aureus* a β -lactámicos mediante técnicas moleculares a partir de muestras de leche de bovinos con mastitis subclínica y de secreciones nasales de los operarios.” <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/8f6c7de4-607e-4437-ac05-1bea289c20a7/content>
- Behzadi, P., & Gajdács, M. (2021). Writing a strong scientific paper in medicine and the biomedical sciences: a checklist and recommendations for early career researchers. *Biologia Futura* 2021 72:4, 72(4), 395–407. <https://doi.org/10.1007/S42977-021-00095-Z>
- Brdová, D., Ruml, T., & Viktorová, J. (2024). Mechanism of staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 77, 101147. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2024.101147>
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC Veterinary Research* 2022 18:1, 18(1), 115-. <https://doi.org/10.1186/S12917-022-03197-5>
- Carrera Molina, D. M. (2026). “Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina a partir de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica en el cantón Tisaleo.” <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/a7ee3a98-2ec0-4745-a7d0-489de67fa648/content>
- Cervera-Alamar, M., Guzmán-Markevitch, K., Žiemytė, M., Ortí, L., Bernabé-Quispe, P., Pineda-Lucena, A., Pemán, J., & Tormo-Mas, M. Á. (2018). Mobilisation

- Mechanism of Pathogenicity Islands by Endogenous Phages in *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Scientific Reports*, 8(1), 16742. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-34918-2>
- Chen, N., & Yuan, X. (2023). A Quick DNA Extraction Method for High Throughput Screening in Gram-positive Bacteria. *Bio-Protocol*, 13(8), e4653. <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.4653>
- Coombs, G. W., Baines, S. L., Howden, B. P., Swenson, K. M., & O'Brien, F. G. (2020). Diversity of bacteriophages encoding Pantone-Valentine leukocidin in temporally and geographically related *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, 15(2), e0228676. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0228676>
- Das, C., Rathore, R., & Singh, V. K. (2025). Prevalence, characterization and antibiogram of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and swine population in Bareilly, Uttar Pradesh, India. *Scientific Reports*, 15(1), 28171. <https://doi.org/10.1038/S41598-025-13369-6>
- Dehkordi, N. V., Rahimi, E., & Jahromi, N. Z. (2024). Prevalence, antimicrobial resistance, virulence gene distribution and SCCmec typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. *Iranian Journal of Microbiology*, 16(5), 605. <https://doi.org/10.18502/IJM.V16I5.16793>
- Dyson, R., Charman, N., Hodge, A., Rowe, S. M., & Taylor, L. F. (2022). A survey of mastitis pathogens including antimicrobial susceptibility in southeastern Australian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 105(2), 1504–1518. <https://doi.org/10.3168/JDS.2021-20955>
- Fang, R., Cui, J., Cui, T., Guo, H., Ono, H. K., Park, C. H., Okamura, M., Nakane, A., & Hu, D. L. (2019). Staphylococcal Enterotoxin C Is an Important Virulence Factor for Mastitis. *Toxins*, 11(3), 141. <https://doi.org/10.3390/TOXINS11030141>

- FAO. (2025). *DAIRY MARKET REVIEW Overview of global market developments in 2024*. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/0d426149-7840-40ae-8d6f-8e6b7dad3c10/content>
- Fernandez, J. E., Egli, A., Overesch, G., & Perreten, V. (2024). Time-calibrated phylogenetic and chromosomal mobilome analyses of *Staphylococcus aureus* CC398 reveal geographical and host-related evolution. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49644-9>
- Ferroni, L., Lovito, C., Scoccia, E., Dalmonte, G., Sargenti, M., Pezzotti, G., Maresca, C., Forte, C., & Magistrali, C. F. (2020). Antibiotic Consumption on Dairy and Beef Cattle Farms of Central Italy Based on Paper Registers. *Antibiotics*, 9(5), 273. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9050273>
- Fetsch, A., Etter, D., & Johler, S. (2021). Livestock-Associated Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*—Current Situation and Impact From a One Health Perspective. *Current Clinical Microbiology Reports*, 8(3), 103–113. <https://doi.org/10.1007/S40588-021-00170-Y/TABLES/2>
- Galeano, M. B., Robaldi, S. A., Gordillo, T. B., Ricardi, M. M., Cassanelli, P. M., Pereda, R. O., Palomino, M. M., & Tribelli, P. M. (2025). Optimized DNA extraction protocol for *Staphylococcus aureus* strains utilizing liquid nitrogen. In *Revista Argentina de Microbiologia* (Vol. 57, Number 3, pp. 217–220). Asociacion Argentina de Microbiologia. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.12.006>
- Gobierno Autónomo Descentralizado del Cantón Cevallos. (2026). *GAD Municipal Cevallos*. <https://www.cevallos.gob.ec/>
- González-Machado, C., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2024). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Dairy Products and Bulk-Tank Milk (BTM). *Antibiotics*, 13(7), 588. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13070588>

- Grunert, T., Stessl, B., Wolf, F., Sordelli, D. O., Buzzola, F. R., & Ehling-Schulz, M. (2018). Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. *Scientific Reports*, 8(1), 15968. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-34371-1>
- Hatoum-Aslan, A. (2021). The phages of staphylococci: critical catalysts in health and disease. In *Trends in Microbiology* (Vol. 29, Number 12, pp. 1117–1129). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.04.008>
- Hoque, M. N., Talukder, A. K., Saha, O., Hasan, M. M., Sultana, M., Rahman, A. A., & Das, Z. C. (2022). Antibigram and virulence profiling reveals multidrug resistant *Staphylococcus aureus* as the predominant aetiology of subclinical mastitis in riverine buffaloes. *Veterinary Medicine and Science*, 8(6), 2631. <https://doi.org/10.1002/VMS3.942>
- Humphrey, S., San Millán, Á., Toll-Riera, M., Connolly, J., Flor-Duro, A., Chen, J., Ubeda, C., MacLean, R. C., & Penadés, J. R. (2021). Staphylococcal phages and pathogenicity islands drive plasmid evolution. *Nature Communications*, 12(1), 5845. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-26101-5>
- Islam, M. M., Hossain, M. I., Islam, M. S., Azam, M. G., & Sultana, S. (2025). Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh. *Heliyon*, 11(3), e42107. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2025.E42107>
- Jiang, J. H., Cameron, D. R., Nethercott, C., Aires-De-Sousa, M., & Peleg, A. Y. (2023). Virulence attributes of successful methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 36, Number 4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/cmr.00148-22>
- Johler, S., Macori, G., Bellio, A., Acutis, P. L., Gallina, S., & Decastelli, L. (2018). Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw

- milk cheese production process in artisan dairies in Italy. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 2915–2920. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13815>
- Jung, H. R., & Lee, Y. J. (2022). Characterization of Virulence Factors in Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bulk Tank Milk. *Animals*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/ani12030301>
- Kerek, Á., Németh, V., Szabó, Á., Papp, M., Bányai, K., Kardos, G., Kaszab, E., Bali, K., Nagy, Z., Süth, M., & Jerzsele, Á. (2024). Monitoring Changes in the Antimicrobial-Resistance Gene Set (ARG) of Raw Milk and Dairy Products in a Cattle Farm, from Production to Consumption. *Veterinary Sciences*, *11*(6), 265. <https://www.mdpi.com/2306-7381/11/6/265/htm>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB), 239909. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00108/TEXT>
- Krishnamoorthy, P., Suresh, K. P., Jayamma, K. S., Shome, B. R., Patil, S. S., & Amachawadi, R. G. (2021). An understanding of the global status of major bacterial pathogens of milk concerning bovine mastitis: A systematic review and meta-analysis (scientometrics). *Pathogens*, *10*(5), 545. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10050545/S1>
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
- Larsen, J., Raisen, C. L., Ba, X., Sadgrove, N. J., Padilla-González, G. F., Simmonds, M. S. J., Loncaric, I., Kerschner, H., Apfalter, P., Hartl, R., Deplano, A., Vandendriessche, S., Černá Bolfíková, B., Hulva, P., Arendrup, M. C., Hare, R. K., Barnadas, C., Stegger, M., Sieber, R. N., ... Larsen, A. R. (2022). Emergence of

- methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. *Nature*, 602(7895), 135. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-04265-W>
- Lee, S. M., Balakrishnan, H. K., Doeven, E. H., Yuan, D., & Guijt, R. M. (2023). Chemical Trends in Sample Preparation for Nucleic Acid Amplification Testing (NAAT): A Review. In *Biosensors* (Vol. 13, Number 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/bios13110980>
- Lienen, T., Schnitt, A., Hammerl, J. A., Maurischat, S., & Tenhagen, B. A. (2021). Genomic Distinctions of LA-MRSA ST398 on Dairy Farms From Different German Federal States With a Low Risk of Severe Human Infections. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575321>
- Liu, H., Dong, L., Zhao, Y., Meng, L., Wang, J., Wang, C., & Zheng, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Different Raw Milk Samples in China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840670>
- Liu, H., Ji, X., Wang, H., Hou, X., Sun, H., Billington, C., Zhang, L., Wang, X., & Wang, R. (2023). Genomic epidemiology and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Jiangsu, China: emerging broader host tropism strain clones ST59 and ST398. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1266715. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1266715/FULL>
- Madhaiyan, M., Wirth, J. S., & Saravanan, V. S. (2020). Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliicoccus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5926–5936. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004498>

- Mbindyo, C. M., Gitao, G. C., & Mulei, C. M. (2020). Prevalence, Etiology, and Risk Factors of Mastitis in Dairy Cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Veterinary Medicine International*, 2020, 8831172. <https://doi.org/10.1155/2020/8831172>
- Ministerio de Salud Pública. (2025). *ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR AGUA Y ALIMENTOS*. <https://www.salud.gob.ec/subsecretaria-nacional-de-vigilancia-prevencion-y-control-de-la-salud/>
- Miragaia, M. (2018). Factors Contributing to the Evolution of mecA-Mediated β -lactam Resistance in Staphylococci: Update and New Insights From Whole Genome Sequencing (WGS). *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 2723. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02723>
- Mulchandani, R., Wang, Y., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. P. (2023). Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. *PLOS Global Public Health*, 3(2), e0001305. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGPH.0001305>
- Muzo Moreta, Á. V. (2026). “Identificación de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina a partir de la muestra de leche de vacas con mastitis subclínica en haciendas del cantón Pillaro.” <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/a56e7586-2224-4d42-8304-ab463894e663/content>
- Nadiya, S., Kolla, H. B., & Reddy, P. N. (2023). Optimization and evaluation of a multiplex PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* and its major virulence genes for assessing food safety. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00906-6>
- National Center for Biotechnology Information. (2026). *Taxonomy Browser - NCBI - NLM*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/browser/?taxon=1280>
- Neelam, Jain, V. K., Singh, M., Joshi, V. G., Chhabra, R., Singh, K., & Rana, Y. S. (2022). Virulence and antimicrobial resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus*

- associated with clinical mastitis in cattle. *PLOS ONE*, 17(5), e0264762. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0264762>
- Patel, H., & Rawat, S. (2023). A genetic regulatory see-saw of biofilm and virulence in MRSA pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1204428. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1204428>
- Penadés, J. R., Seed, K. D., Chen, J., Bikard, D., & Rocha, E. P. C. (2025). Genetics, ecology and evolution of phage satellites. *Nature Reviews Microbiology* 2025 23:7, 23(7), 410–422. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01156-z>
- Pérez, V. K. C., Custódio, D. A. C., Silva, E. M. M., de Oliveira, J., Guimarães, A. S., Brito, M. A. V. P., Souza-Filho, A. F., Heinemann, M. B., Lage, A. P., & Dorneles, E. M. S. (2020). Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 2111. <https://doi.org/10.1007/S42770-020-00363-5>
- Rafael Ciges-Tomas, J., Alite, C., Humphrey, S., Donderis, J., Bowring, J., Salvatella, X., Penadés, J. R., & Marina, A. (2019). The structure of a polygamous repressor reveals how phage-inducible chromosomal islands spread in nature. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 3676-. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11504-2>
- Raghuram, V., Robert A Petit, I., Karol, Z., Mehta, R., Weissman, D. B., & Read, T. D. (2024). Average Nucleotide Identity based *Staphylococcus aureus* strain grouping allows identification of strain-specific genes in the pangenome. *BioRxiv*, 2024.01.29.577756. <https://doi.org/10.1101/2024.01.29.577756>
- Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J. R., Watts, J. L., Koop, G., & Middleton, J. R. (2018). Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 149–165. <https://doi.org/10.1111/TBED.12698>

- Ren, Q., Liao, G., Wu, Z., Lv, J., & Chen, W. (2020). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3368–3380. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-17420>
- Rocha, L. S., Silva, D. M., Silva, M. P., Vidigal, P. M. P., Silva, J. C. F., Guerra, S. T., Ribeiro, M. G., De Mendes, T. A. O., & De Ribon, A. O. B. (2019). Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. *PLoS ONE*, 14(8), e0220804. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0220804>
- Rønning, T. G., Enger, H., Afset, J. E., & Ås, C. G. (2025). Trends and characteristics of multidrug-resistant MRSA in Norway 2008-2020. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1564943. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1564943/FULL>
- Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C. R., Da Silva, L. B. B., Fernandes Júnior, A., Campos, F. C., Pantoja, J. C. F., Santos, M. V., Gonçalves, J. L., Tomazi, T., Silva, N. C. C., & Rall, V. L. M. (2026). Association of *Staphylococcus aureus* virulence factors with clinical and subclinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 109(4), 4371–4382. <https://doi.org/10.3168/JDS.2025-27540>
- Roy, M. C., Chowdhury, T., Hossain, M. T., Hasan, M. M., Zahran, E., Rahman, M. M., Zinnah, K. M. A., Rahman, M. M., & Hossain, F. M. A. (2024). Zoonotic linkage and environmental contamination of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in dairy farms: A one health perspective. *One Health*, 18, 100680. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2024.100680>
- S. Gautam, S., KC, R., WC Leong, K., Aogáin, M. Mac, & F. O'Toole, R. (2019). A step-by-step beginner's protocol for whole genome sequencing of human bacterial pathogens. *Journal of Biological Methods*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.14440/JBM.2019.276>

- Sadat, A., Shata, R. R., Farag, A. M. M., Ramadan, H., Alkhedaide, A., Soliman, M. M., Elbadawy, M., Abugomaa, A., & Awad, A. (2022). Prevalence and Characterization of PVL-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Cow's Milk. *Toxins*, 14(2), 97. <https://doi.org/10.3390/TOXINS14020097/S1>
- Sanjulián, L., Fernández-Rico, S., González-Rodríguez, N., Cepeda, A., Miranda, J. M., Fente, C., Lamas, A., & Regal, P. (2025). The Role of Dairy in Human Nutrition: Myths and Realities. In *Nutrients* (Vol. 17, Number 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu17040646>
- Shahid, M., Hussain, R., Nawaz, Z., Aslam, B., Ahmad, M. Z., Siddique, A. B., Ahsan, H., Fatima, A., Khan, I., Mustafa, B., Iqbal, R., Al Syaad, K. M., & Shami, A. (2023). Occurrence of Virulence Genes among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Subclinical Bovine Mastitis. *ACS Omega*, 8(41), 38111. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C04206>
- Shahzad, M. A., Yousaf, A., Ahsan, A., Irshad, H., Riaz, A., Khan, A., Ullah, I., Sattar, S., Bostan, N., & Javed, S. (2024). Virulence and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the Pakistani Pothohar region. *Scientific Reports*, 14(1), 14569. <https://doi.org/10.1038/S41598-024-65448-9>
- Shalaby, M., Reboud, J., Forde, T., Zadoks, R. N., & Busin, V. (2024). Distribution and prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw ruminants' milk: A systematic review. *Food Microbiology*, 118. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104405>
- Silva, V., Araújo, S., Monteiro, A., Eira, J., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., Lemsaddek, T. S., & Poeta, P. (2023). *Staphylococcus aureus* and MRSA in Livestock: Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 124, 11(1), 124. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11010124>

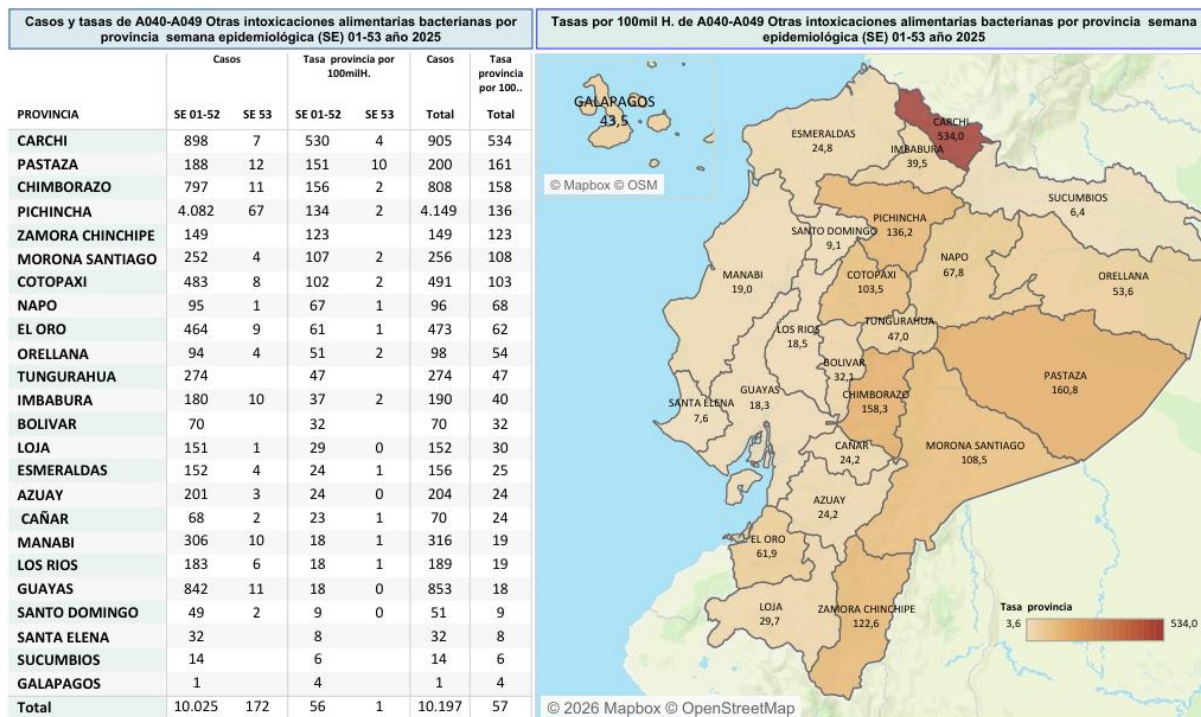
- Silveira, E. A., de Sousa Romeiro, A. M., & Noll, M. (2022). Guide for scientific writing: how to avoid common mistakes in a scientific article. *Journal of Human Growth and Development*, 32(3), 341–352. <https://doi.org/10.36311/JHGD.V32.13791>
- Smith, N. W., Fletcher, A. J., Hill, J. P., & McNabb, W. C. (2022). Modeling the Contribution of Milk to Global Nutrition. *Frontiers in Nutrition*, 8, 716100. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.716100/TEXT>
- Taher, D. D., Yassin, S. A., & Abdulkareem, M. H. (2021). Isolation and molecular detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from raw milk of cows. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35, 137–141. <https://doi.org/10.33899/IJVS.2021.131957.2030>
- Tegegne, D. T., Mamo, G., Waktole, H., & Messele, Y. E. (2021). Molecular characterization of virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Ethiopia. *Annals of Microbiology* 2021 71:1, 71(1), 28-. <https://doi.org/10.1186/S13213-021-01639-3>
- Tenezaca Lliguin, N. M., Orellana Bravo, P. P., Andrade Tacuri, C. F., & Ortiz Tejedor, J. G. (2025). *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de teléfonos móviles de estudiantes de Enfermería en Cuenca, Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología*, 57(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2024.12.002>
- Toainga Cunalata, M. B. (2026). “*Identificación de Staphylococcus aureus resistente a meticilina a partir de la muestra de leche de vacas con mastitis subclínica en haciendas del cantón Pelileo.*” <https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/2be33108-e12f-4aa4-9db8-del3a4314266/content>
- Touaitia, R., Ibrahim, N. A., Touati, A., & Idres, T. (2025). *Staphylococcus aureus* in Bovine Mastitis: A Narrative Review of Prevalence, Antimicrobial Resistance, and

- Advances in Detection Strategies. *Antibiotics* 2025, Vol. 14, Page 810, 14(8), 810.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14080810>
- Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Idres, T., & Touati, A. (2025). *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics* 2025, Vol. 14, Page 470, 14(5), 470.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14050470>
- Turchi, B., Campobasso, C., Nardinocchi, A., Wagemans, J., Torracca, B., Lood, C., Di Giuseppe, G., Nieri, P., Bertelloni, F., Turini, L., Ruffo, V., Lavigne, R., & Di Luca, M. (2024). Isolation and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage Hesat from dairy origin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13129-y>
- Ullah, N., Nasir, S., Ishaq, Z., Anwer, F., Raza, T., Rahman, M., Alshammari, A., Alharbi, M., Bae, T., Rahman, A., & Ali, A. (2022). Comparative Genomic Analysis of a Pantone–Valentine Leukocidin-Positive ST22 Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Antibiotics*, 11(4).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11040496>
- Umbrasko, I., Batjuka, A., & Petjukevičs, A. (2022). EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF USING A UNIVERSAL METHOD FOR ISOLATING GENOMIC dsDNA BY SALTING OUT TECHNIQUE ACCORDING TO THE S.M. ALJANABI AND I. MARTINEZ PROTOCOL FOR YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. In *Acta Biol. Univ. Daugavp* (Vol. 22, Number 2).
- Wodaje, A., Belete, M. A., Menkir, A. S., Zegeye, Z. B., & Yihunie, F. B. (2025). Detection of Virulence Genes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolates From Bovine Mastitis in Chagni, Northwestern Ethiopia. *Veterinary Medicine International*, 2025(1).
<https://doi.org/10.1155/vmi/6473601>

- Yang, J., Zhang, T., Yang, B., Liu, J., Li, Z., & Yamaguchi, Y. (2025). High-Resolution Analysis of DNA Electrophoretic Separations via Digital Image Processing. *Separations*, 12(11), 296. <https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS12110296/S1>
- Zhu, L., Lai, Y., Li, X., Ma, H., Gong, F., Sun, X., Cao, A., Jiang, T., Han, Y., & Pan, Z. (2024). Molecular and epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in China. *Microbial Pathogenesis*, 191, 106640. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2024.106640>

ANEXOS

Anexo 1. Casos y tasas de otras intoxicaciones alimentarias bacterianas (A040-A049) por provincias en Ecuador, semana epidemiológica 01-53, año 2025.



Anexo 2. Reactivación de cepas, preparación de medios de cultivo y siembra



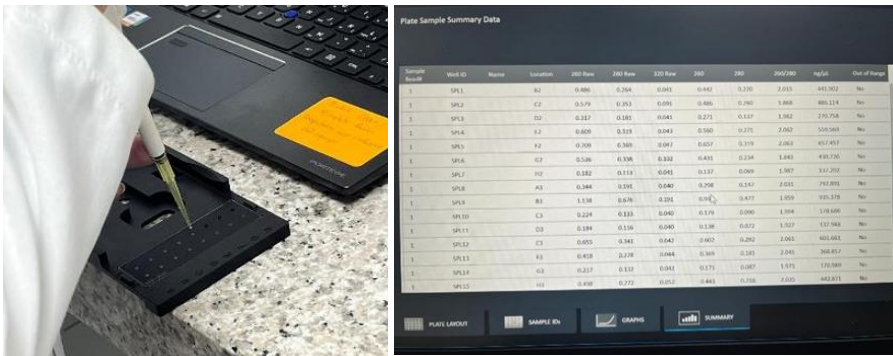
Anexo 3.*Confirmación de pureza, siembra en medio específico (manitol salado y tinción de gram)*



Anexo 4.*Extracción de ADN método salino por (Aljanabi & Martinez, 1997).*



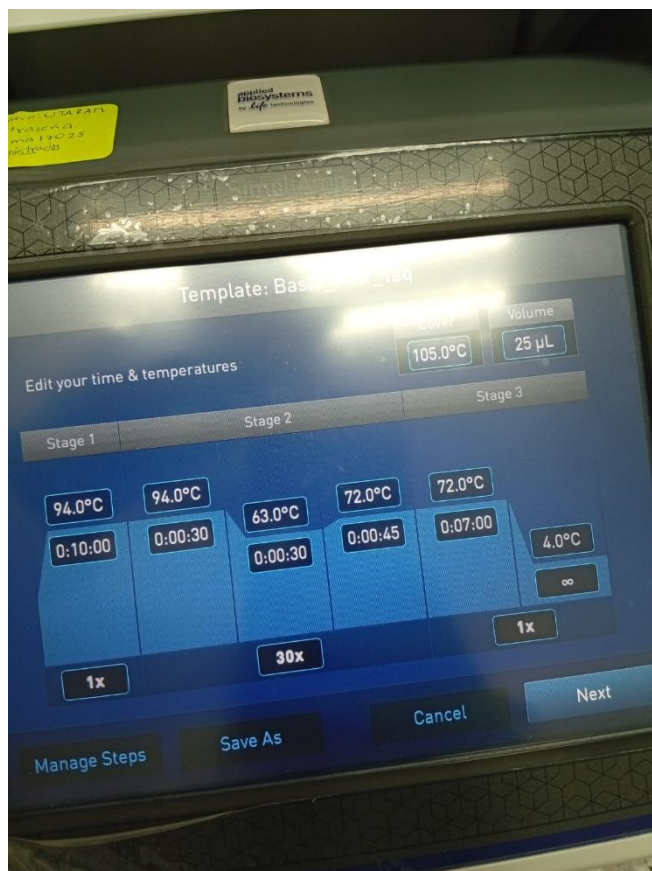
Anexo 5.*Cuantificación de ADN*



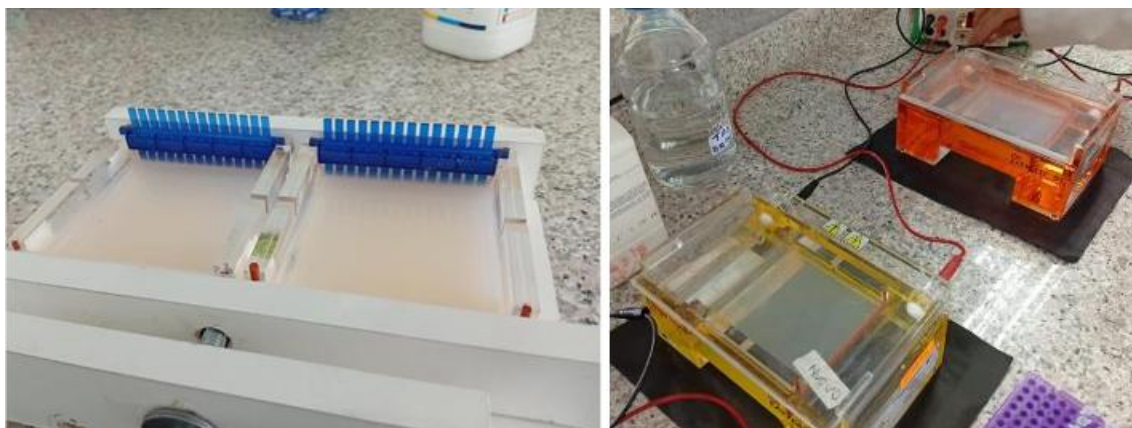
Anexo 6. Preparación de Master mix para PCR



Anexo 7. Condiciones de PCR para prueba de amplificación con el gen sec



Anexo 8. *Electroforesis*



Anexo 9. *Visualización y documentación fotográfica de geles en transiluminador.*

