

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PERSISTENCIA EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS BOVINAS DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE INFECCIONES INTRAMAMARIAS TRANSITORIAS Y PERSISTENTES

Pirola, Silvana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral) UNL-CONICET

Directora: Dallard, Bibiana  
Co-directora: Renna, M. Sol

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, persistencia, células epiteliales mamarias bovinas

### INTRODUCCIÓN

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria (GM) en respuesta a una agresión local al tejido. El origen puede ser infeccioso, mecánico o tóxico. La mayoría de los casos de mastitis bovina se deben a infecciones intramamarias (IIM) causadas por microorganismos, principalmente bacterias, que invaden la glándula, se desarrollan y generan productos tóxicos perjudiciales para el tejido mamario. Dicha patología, es la más frecuente de las vacas lecheras y tiene efectos perjudiciales sobre el bienestar animal y la rentabilidad del establecimiento lechero (Ruegg, 2017).

Si bien puede ser causada por numerosos agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno contagioso más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina (Dieser y col., 2014), como en otros países de gran desarrollo lechero (Bardiau y col., 2016). Este microorganismo posee la habilidad de invadir y sobrevivir dentro de células epiteliales mamarias (CEM), neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000; Sinha y Fraunholz, 2010). Esta forma de vida intracelular podría facilitar la persistencia de *S. aureus* en la GM, protegiéndose de los tratamientos antimicrobianos y de las defensas inmunes del hospedador. De esta manera, *S. aureus* tiende a permanecer en la GM dando origen a infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario sin producir inflamación aparente y/o manifestación clínica (Ruegg, 2017).

Trabajos previos han demostrado que determinadas características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *S. aureus* guardan relación con la capacidad de adherencia, invasión y persistencia en las células de la GM bovina (Sacco y col., 2020). En este contexto, se han observado asociaciones entre la capacidad de formar biopelículas, la formación de cápsula, el grupo agr y la expresión de genes que codifican para proteínas superficiales (como las proteínas de unión a fibronectina) con la capacidad de adherencia e invasión de *S. aureus* en CEM bovinas (Pererya y col., 2016; Sacco y col., 2020). Por otro lado, numerosos trabajos han demostrado que este patógeno posee un conjunto de factores bacterianos asociados con la persistencia intracelular, incluyendo el sistema Agr, el factor alternativo SigB, la  $\alpha$ -toxina y

Título del proyecto: ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN INTRACELULAR DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADAS DE INFECCIONES INTRAMAMARIAS PERSISTENTES Y TRANSITORIAS EN BOVINOS.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: ANPCYT

Director/a: Dallard, Bibiana.

la capacidad de formar fenotipos bacterianos alterados o variantes de colonias pequeñas (SCV) (Tuchscher y col., 2015).

### OBJETIVO

- Evaluar la capacidad de persistencia en células de epitelio mamario bovino de cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones transitorias (T) y persistentes (P), seleccionadas según criterios fenotípicos y genotípicos.

### METODOLOGÍA

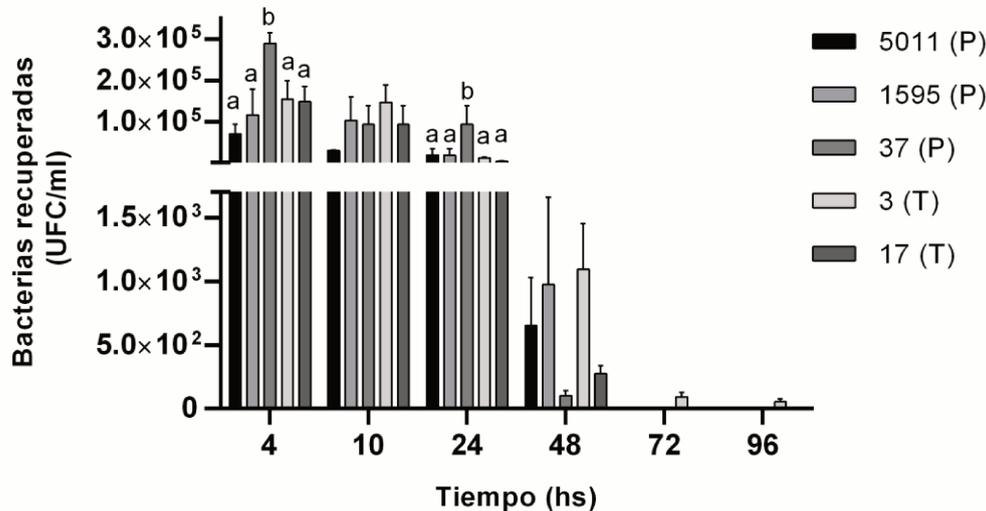
Se seleccionaron 5 cepas de *S. aureus* con diferentes perfiles genéticos y capacidad de adaptación a la GM bovina. Las relaciones clonales entre los aislados se evaluaron en estudios previos mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE) (Pereyra y col., 2016). Además, para asegurar la diversidad genética, las cepas fueron caracterizadas mediante genotipificación de ADN basado en microarreglos lo que permitió asignar cada cepa a un complejo clonal (Sacco y col., 2020). Las cepas aisladas por única vez del cuarto mamario y que no fueron re-aisladas durante la lactancia en muestreos consecutivos mensuales luego del tratamiento antibiótico, fueron consideradas de baja adaptación a la GM bovina o T (cepas: 3 y 17). Las cepas que fueron aisladas del mismo cuarto mamario durante tres o más muestreos consecutivos mensuales durante la lactancia en un periodo de 6 meses fueron consideradas altamente adaptadas a la GM bovina o P (cepas: 37, 1595 y 5011).

Se evaluó la capacidad de las cepas de *S. aureus* de sobrevivir intracelularmente en una línea de células epiteliales mamarias bovinas (*Transformed mammary epithelial cells*, MAC-T) durante 4, 10, 24, 48, 72 y 96 hs post infección. Las monocapas de células MAC-T fueron infectadas con las cepas de *S. aureus* empleando una multiplicidad de infección (MOI) de 30:1 bacterias/célula. Las placas se incubaron durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adherencia e internalización de las bacterias. Posteriormente, se lavaron con una solución de PBS estéril y se incubaron 2 hs con medio de cultivo conteniendo gentamicina (100 µg/ml) a fin de eliminar las bacterias extracelulares. Post-incubación, las monocapas celulares se lavaron 2 veces con PBS 1X y se agregó Tritón en agua destilada estéril a los pocillos correspondientes a las 4 hs post-infección. Se realizaron diluciones en base 10, las cuales se sembraron por triplicado en placas de agar manitol salado que fueron incubadas por 24 hs a 37°C. Finalmente, se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) intracelulares recuperadas. Al resto de los pocillos se les realizó el cambio de medio de cultivo suplementado con gentamicina (300 µg/ml) a fin de evitar el agotamiento de nutrientes y la reinfección de la monocapa por las bacterias que fueran liberadas por las células que mueren. Este procedimiento se repitió cada 24 hs. Finalizado cada uno de los tiempos de infección se procedió de la misma manera que se mencionó anteriormente con los pocillos correspondientes a las 4 hs. Estos ensayos se realizaron por triplicado para cada una de las cepas evaluadas. El análisis estadístico de los datos se efectuó mediante ANOVA y post test de Duncan utilizando el programa SPSS 11.0 para Windows.

### RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En todas las cepas de *S. aureus* estudiadas se observó una disminución gradual del número de UFC recuperadas durante los diferentes tiempos de infección (Figura 1). No se observó relación entre la capacidad de este microorganismo de persistir en células MAC-T y el origen de las cepas (T o P) para cada uno de los tiempos evaluados. A las 4 hs y 24 hs post-infección se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el número de UFC recuperadas entre la cepa 37 (P) y el resto. A ambos tiempos dicha cepa sobrepasó el valor medio de bacterias recuperadas de las cepas restantes. Las cepas 5011, 1595, 37 (P) y 17 (T) lograron persistir

en el interior de las células MAC-T durante 48 hs. Mientras que la cepa 3 (T) mostró una mayor capacidad de supervivencia intracelular recuperándose hasta 96 hs post-infección.



**Figura 1.** Supervivencia intracelular de cepas de *S. aureus* en células MAC-T. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En función de los resultados se puede concluir que la capacidad de supervivencia intracelular de las cepas de *S. aureus* en células MAC-T no se asoció con el origen de las mismas (T o P). La expresión diferencial de numerosos genes que codifican para proteínas de adhesión, invasión y supervivencia intracelular, podrían explicar el comportamiento particular de cada una de las cepas de *S. aureus* en la compleja red de interacción patógeno-hospedador. Estos resultados constituyen el paso inicial para investigar si la capacidad de persistencia en células MAC-T de las cepas se relaciona con la expresión diferencial de factores de virulencia asociados al proceso de infección, por lo que se proponen ensayos futuros de evaluación de la expresión génica de estos factores en las cepas de *S. aureus* a diferentes tiempos post-infección.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Almeida, RA; Matthews, KR; Cifrian, E; Guidry, AJ; Oliver, SP.** 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science* 79(6): 1021-1026.
- Bardiau, M; Caplin, J; Dettleux, J; Graber, H; Moroni, P; Taminiau, B; Mainil, JG.** 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolates from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and *agr*-typing. *Veterinary Microbiology* 185: 1-6.
- Dieser, SA; Vissio, C; Lasagno, MC; Bogni, CI; Larriestra, AJ; Odierno, LM.** 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in argentinean dairy herds. *Pakistan Veterinary Journal* 34(1): 124-126.
- Hebert, A; Sayasith, K; Senechal, S; Dubreuil, P; Lagace, J.** 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiology Letters*. 193:57-62.
- Pereyra, EAL; Picech, F; Renna, MS; Baravalle, C; Andreotti, C; Russi, R; Calvino, LF; Diez, C; Dallard, BE.** 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology* 183:69-77.
- Ruegg, PL.** 2017. A 100-year review: mastitis detection, management and prevention. *Journal of Dairy*

Science 100: 10381-10397.

**Sacco, SC; Velázquez, NS; Renna, MS; Beccaria, C; Baravalle, C; Pereyra, EAL; Monecke, S; Calvinho, LF; Dallard, BE.** 2020. Capacity of two *Staphylococcus aureus* strains with different adaptation genotypes to persist and induce damage in bovine mammary epithelial cells and to activate macrophages. *Microbial Pathogenesis* 142: 104017.

**Sinha, B; Fraunholz, M.** 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International Journal of Medical Microbiology* 300:170-175.

**Tuscherr, L; Bischoff, M; Lattar, SM; Noto Llana, M; Pförtner, H; Niemann, S; Geraci, J; Van de Vyver, H; Fraunholz, MJ; Cheung, AL; Herrmann, M; Völker, U; Sordelli, DO; Peters, G; Löffler, B.** 2015. Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic Infections. *PLoS Pathogens* 11:e1004870.