



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR APLICADA
ICIVET-LITORAL (UNL-CONICET)

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

***“ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO SOBRE ASPECTOS DE
LA INTERACCIÓN PATÓGENO-HOSPEDADOR A
PARTIR DE CEPAS SELECCIONADAS DE *Staphylococcus
aureus* PROCEDENTES DE INFECCIONES
INTRAMAMARIAS EN BOVINOS”***

AUTORA: Méd. Vet. Elizabet Pereyra

DIRECTORA: Dra. Bibiana Dallard

CO-DIRECTOR: PhD. Luis Fernando Calvino

Las grandes obras son hechas no con la fuerza, sino con la perseverancia...

Samuel Johnson

A mis padres...

A mis abuelos...

Agradecimientos...

A Dios por estar presente en todo los momentos de mi vida, guiándome por el camino correcto.

A mi familia, a mis padres y hermanos, que son quienes me brindaron consejo, ayuda y aliento en las buenas y en las malas. Sin su apoyo y amor incondicional nunca hubiese llegado a esta instancia.

A mi directora Dra. Bibiana Dallard que confió en mí, guiándome e invirtiendo su tiempo, dedicación y experiencia en mi formación. Gracias, por sus consejos, instrucción y correcciones.

A mi codirector PhD. Luis Calvinho, por brindar sus conocimientos y por su gran disposición en todas mis inquietudes.

Al Dr. Hugo Ortega, por brindarme la posibilidad de trabajar en el ICIVET-Litoral y permitir realizar mis ensayos de tesis en el CMC.

A las Doctoras María Sol Renna y Celina Baravalle por su colaboración en la parte experimental de esta tesis y estar siempre dispuestas a prestar sus conocimientos.

A las Doctoras Natalia Salvetti y Florencia Rey por estar siempre dispuestas a compartir sus experiencias y conocimientos.

A todos mis compañeros y amigos de trabajo: Carolina Andreotti, Ayelen Amweg, Fernanda Rodríguez, Carolina Panzani, Belkis Marelli, Valentina Matiller, Ma. Eugenia Baravalle, Melisa Velázquez, Mónica Cadoche Antonela Stassi, Marcelo Zayas, Pablo Díaz, Gustavo Hein, Matías Belotti, Pablo Siroski, Leandro Neme, Emilia Huber, Natalia Gareis, Natalia Alfaro, Sofia Sacco, Camila Beccaria, Paula Silvestrini, Andrea Duré, Ma. Belén Peralta, Candela Regue, Mauricio Kern, Carlos Franco, Nicolás Picchioti. A los que seguimos trabajando juntos y a los que ya tomaron otro rumbo, muchas gracias a todos uds por sus palabras día a día y por los momentos compartidos.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Tecnología Inmunológica (FBCB), Lic. Florencia Picech, Dra. Cristina Diez y Dra. Sol Barbagellata

A Norma Russi por realizar técnicas para complementar mis resultados.

Al INTA Rafaela: Cecilia Camussone, Ariel Amadio, Verónica Neder, Vilma Gianre, Miguel Marín, por su buena predisposición, en todo aquello que necesité.

A los demás laboratorios que conforman el ICiVET-Litoral (Salud Pública, LECEN), por la colaboración prestada.

A mis compañeros de Cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL.

A mis amigas de siempre Melisa, Judith, Ana, Ivana, Andrea, Virginia, Mónica, Viviana, por acompañarme de cerca y de lejos.

A Alejandro por su compañerismo, paciencia, comprensión y ánimos en todo momento.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias, por brindarme la posibilidad de formación doctoral en esta Institución, especialmente al Mgter. Humberto Occhi quien ha sido la persona que me propuso continuar en esta Facultad y realizar esta tesis doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la Beca que me permitió realizar los estudios de posgrado en la carrera del doctorado en Ciencias Veterinarias.

A todos GRACIAS!!!

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS UTILIZADAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Mastitis bovina.....	2
1.1.1. Generalidades.....	2
1.1.2. Importancia económica.....	3
1.1.3. Formas de manifestación.....	3
1.1.4. Principales patógenos causantes de mastitis.....	5
1.2. Mastitis por Staphylococcus aureus.....	6
1.2.1. Estructura y factores de virulencia de Staphylococcus aureus.....	9
1.2.1.1. Adhesinas.....	11
1.2.1.2. Polisacáridos capsulares.....	16
1.2.1.3. Biofilm.....	20
1.3. Inmunidad de la glándula mamaria.....	27
1.3.1. Reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune innata.....	28
1.3.2. Células más relevantes que participan en la respuesta inmune.....	32
1.3.3. Citoquinas y quimioquinas.....	40
1.4. Modelo murino de infección experimental con S. aureus.....	49
2. OBJETIVOS	52
2.1. Objetivo general e hipótesis de trabajo.....	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1. Selección de las cepas de Staphylococcus aureus.....	56
3.2. Caracterización fenotípica de las cepas de S. aureus.....	57
3.3. Caracterización molecular de las cepas de S. aureus.....	60
3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.....	60

3.3.2. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes.....	62
3.4. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.....	65
3.5. Evaluación de la presencia de genes de adherencia, formación de biofilm, PC y resistencia a penicilina en el genoma de <i>S. aureus</i>	67
3.6. Ensayos de internalización de <i>S. aureus</i> en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).....	70
3.6.1. Extracción de ARN mensajero (ARNm) bacteriano.....	72
3.6.2. Retrotranscripción (RT).....	72
3.6.3. Evaluación de los niveles de expresión relativa de genes de adherencia y formación de biofilm de <i>S. aureus</i> en un modelo de infección in vitro.....	73
3.6.3.1. Evaluación y selección del gen estándar interno para PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR).....	75
3.6.3.2. Amplificación por PCR mediante oligonucleótidos pre-seleccionados.....	75
3.6.3.3. Programa para la selección del gen estándar interno.....	77
3.6.3.4. Cálculo de la eficiencia (E) de amplificación del gen housekeeping y genes Target.....	78
3.6.3.5. Cuantificación del nivel de expresión de genes de adherencia y de formación de biofilm de <i>S. aureus</i>	78
3.7. Curvas de crecimiento de <i>S. aureus</i>	79
3.8. Diseño experimental de un modelo murino de infección intramamaria con <i>S. aureus</i>	81
3.8.1. Selección de las cepas a inocular en la glándula mamaria de ratón.....	81
3.8.2. Animales.....	82
3.8.3. Diseño experimental.....	83
3.8.4. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).....	84
3.8.5. Evaluación del daño tisular y reacción inflamatoria.....	85
3.8.5.1. Coloración de hematoxilina-eosina.....	85
3.8.6. Cuantificación de células inmunes en tejido mamario por inmunohistoquímica.....	86
3.8.6.1. Procedimiento general de IHQ indirecta.....	87
3.8.6.2. Controles de la técnica.....	88
3.8.6.3. Análisis digital de imágenes y cuantificación de las células inmunes.....	89
4. RESULTADOS.....	91
4.1. Caracterización fenotípica de las cepas de <i>S. aureus</i>	92
4.2. Caracterización molecular de los aislamientos de <i>S. aureus</i>	97
4.2.1. Identificación genotípica de especie.....	97
4.2.2. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes.....	98

4.3. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.....	102
4.4. Evaluación de la presencia de genes relacionados con adherencia, formación de biofilm, PC y resistencia a penicilina en el genoma de <i>S. aureus</i>	103
4.5. Ensayos de internalización de <i>S. aureus</i> en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).....	105
4.6. Evaluación y selección del gen estándar interno para PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR).....	107
4.6.1. Cálculo de la eficiencia (E) de amplificación del gen housekeeping y genes target.....	109
4.7. Determinación de la expresión relativa (R) de genes de adherencia y formación de biofilm a partir de cepas de <i>S. aureus</i> en el modelo de invasión in vitro.....	110
4.8. Curvas de crecimiento de <i>S. aureus</i>	112
4.9. Diseño experimental de un modelo murino de infección intramamaria con <i>S. aureus</i>	115
4.9.1. Puesta a punto del modelo y selección de la dosis de bacterias a inocular en la glándula mamaria de ratón.....	115
4.9.2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).....	116
4.9.3. Evaluación del daño tisular y reacción inflamatoria.....	118
4.9.4. Evaluación de componentes celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa.....	133
4.9.4.1. Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la expresión de CD14.....	133
4.9.4.2. Cuantificación de linfocitos T y linfocitos B, mediante la expresión de CD4, CD8 y CD79.....	136
5. DISCUSIÓN.....	146
5.1. Selección de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	147
5.1.1. Caracterización fenotípica.....	147
5.1.2. Caracterización molecular de los aislamientos de <i>S. aureus</i>	150
5.1.2.1. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes.....	151
5.1.3. Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos.....	154
5.2. Evaluación de la presencia de genes relacionados con adherencia, formación de biofilm, PC y resistencia a penicilina en el genoma de <i>S. aureus</i>	154
5.3. Ensayos de internalización de <i>S. aureus</i> en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).....	158
5.4. Determinación de la expresión relativa (R) de genes de adherencia y formación de biofilm a partir de cepas de <i>S. aureus</i> en el modelo de invasión in vitro.....	161
5.5. Curvas de crecimiento de <i>S. aureus</i>	164
5.6. Persistencia in vivo de las cepas de <i>S. aureus</i> y evaluación del daño tisular y reacción inflamatoria.....	166
5.7. Evaluación de componentes celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa.....	171

6. CONCLUSIONES	180
7. BIBLIOGRAFÍA	183
8. ANEXOS	227
Anexo I	228
Anexo II	233
Anexo III	237

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AMS	Agar manitol sal
ARNm	Ácido ribonucleico (mensajero)
ARNr	Ácido ribonucleico (ribosomal)
ATS	Agar tripteína soya
Bap	Biofilm Associated Protein - Proteína asociada a biofilm
CD	Cluster of differentiation - marcadores de diferenciación
CEM	Células epiteliales mamarias
CfA	Clumping factor A - Proteína de unión al fibrinógenoA
CfB	Clumping factor B - Proteína de unión al fibrinógenoB
Cna	Collagen-binding Adhesin - Proteína de unión a colágeno
C0₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora de antígeno
Ct	Cycle threshold - ciclo umbral
CTS	Caldo tripneína soya
CV	Coefficiente de variación
CWA	Cell wall-anchored - Células asociadas a la pared
DAB	3,3 - Diaminobencidina
DE	Desvío estándar
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNTPs	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DOc	Corte por DO
DTT	Ditiotreitol
E	Eficiencia
Eap	Extracellular adherence protein - Proteína de adherencia extracelular
ECN	Estafilococos coagulasa negativos
Efb	Proteína de unión al fibrinógeno extracelular
Emp	Proteína de unión a la matriz extracelular
EPS	material polimérico extracelular
EtBr	Bromuro de Etidio
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FIL	Factor proteico inhibidor de la secreción de leche
Fn	Fibronectin - Fibronectina
FnBP-A	Fibronectin-Binding Protein A - Proteínas de unión a fibronectina A
FnBP-B	Fibronectin-Binding Protein B - Proteínas de unión a fibronectina B
GM	Glándula mamaria
GS	Glutamina sintetasa
ICAMS	Moléculas de adhesión intercelular
IgG	Inmunoglobulina G
IHQ	Inmunohistoquímica
IIM	Infeción intramamaria

IL	Interleuquina
IM	Intramamario
INF	Interferón
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
K	Potasio
Lf	Lactoferrina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
LUK	Leucotoxinas
MAC-T	Transformed mammary epithelial cells - Células epiteliales mamarias bovinas
MDP	Muramil dipéptido
Mg⁺²	Magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	Multiplicidad de infección
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules - Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz
MyD8	Proteína de diferenciación mieloide primaria
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MMPs	Metalopeptidasas de la matriz
NaCl	Cloruro de Sodio
NET	Neutrophil Extra cellular Trap - trampas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Factor de transformación nuclear- κ B
NK	Natural killer - Células asesinas
NT	No tipificables
°C	Grados centígrados
ON	Overnight- toda la noche
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns - Patrones asociados a patógenos
Pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline - Tampón Fosfato Salino
PC	Polisacáridos capsulares
PCR	Polimerase Chain Reaction - Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis - Electroforesis de campos pulsantes
PGN	Péptidoglicanos
pi	Post-inoculación
PIA	Polysaccharide intercellular adhesin - Proteína de adhesión intracelular
PMN	Polimorfonucleares
PNAG	Poli-N-acetil β -1,6 glucosamina
pbMEC	Cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas
PRR	Pattern recognition receptors - Receptores de reconocimiento de patrones
RCS	Recuento de células somáticas
R	Relación

RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SARMS	S. aureus resistente a la meticilina
SERAMs	Secretable expanded repertoire of adhesive molecule-Repertorio ampliado de moléculas adhesivas secretables
SCV	Small colony variant- variantes de colonias pequeñas
ST	Solución de trabajo
SPA	Proteína A
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TGF-β	Factor transformante del crecimiento- β
TBE	Tris Borato EDTA
TD	Tiempo de duplicación
Th	Respuesta inflamatoria de tipo T helper
TLR	Toll-like receptors-Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
V	Voltio

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Funciones principales de las células que participan en la respuesta inmune innata en la GM y mecanismos potenciales utilizados por <i>Staphylococcus aureus</i> para evadir la respuesta inmune celular.	38
2	Mecanismos inducidos por <i>Staphylococcus aureus</i> que conducen a una respuesta diferenciada de citoquinas en la glándula mamaria bovina según estudios realizados in vivo e in vitro.	48
3	Nombre, secuencia y características del par de oligonucleótidos utilizados en la identificación molecular de <i>S. aureus</i> .	61
4	Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación y sus correspondientes concentraciones finales en un volumen final de 20 μ l.	62
5	Etapas del programa de amplificación utilizado. En cada caso se detalla la cantidad de ciclos como también la duración y la temperatura aplicada.	62
6	Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación junto a la concentración final utilizada para un volumen total de 10 μ l.	68
7	Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes de adherencia y formación de biofilm.	68
8	Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes capsulares (cap5 y cap8).	68
9	Etapas del programa de amplificación utilizado para el gen blaZ.	68
10	Características generales de pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos de genes de <i>S. aureus</i> .	69
11	Reactivos empleados en el protocolo de retrotranscripción.	73
12	Características generales del par de primers empleados para amplificar una sección del gen codificante para ARNr 16S bacteriano.	76
13	Detalle de reactivos y concentraciones empleados en la amplificación del fragmento codificante para ARNr 16S bacteriano en muestras de ADNc de <i>S. aureus</i> .	76
14	Detalle del conjunto de oligonucleótidos amplificantes del segmento que codifica para ADN girasa-subunidad B de <i>S. aureus</i> para su análisis como gen estándar interno.	77
15	Etapas, duración y temperaturas empleadas para amplificar fragmentos de ADNc correspondientes a los posibles genes housekeeping por RT-qPCR.	77

16	Diluciones realizadas de la suspensión celular de cada aislado a diferentes tiempos.	80
17	Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, diluciones de uso, tipo de recuperación antigénica empleada, bloqueo, modo de incubación del anticuerpo primario y proveedor.	88
18A	Pruebas fenotípicas correspondientes a las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de IIM clínicas.	93
18B	Pruebas fenotípicas correspondientes a las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de IIM subclínicas.	94
19A	Resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos por pruebas de difusión en agar, realizados a cepas provenientes de IIM clínicas.	102
19B	Resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos por pruebas de difusión en agar, realizados a cepas provenientes de IIM subclínicas.	103
20	Análisis de la presencia (+) o ausencia (-) de genes de adherencia, formación de biofilm, polisacáridos capsulares y del gen de resistencia a los β -lactámicos en aislados de <i>S. aureus</i> procedentes de IIM clínicas y subclínicas.	104
21	Valor de la pendiente correspondiente a la regresión lineal de la gráfica C_T vs $\log_{10}[\text{ADNc}]$ para cada par de oligonucleótidos.	110
22	Valores de R obtenidos a partir del tratamiento de C_T para cada cepa en condiciones experimentales de co-cultivo con MAC-T frente al correspondiente control.	111
23	Valores de tiempo de duplicación en minutos (') y segundos (") para los aislados de <i>S. aureus</i> .	114
24	Resumen de las lesiones macro y microscópicas inducidas por las cepas A y B de <i>S. aureus</i> en diferentes tiempos post infección.	132

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Colonias y características morfológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	6
2	Funciones de las proteínas de unión a la pared celular (CWA) de <i>S. aureus</i> .	12
3	Modelo del mecanismo de invasión de <i>S. aureus</i> .	13
4	Estructura de <i>S. aureus</i> .	15
5	Micrografías de transmisión electrónica de células de <i>S. aureus</i> en fase estacionaria.	17
6	Etapas en el proceso de formación del biofilm.	21
7	Regulación de la síntesis de PIA.	22
8	Representación de la detección de biofilm en placa de poliestireno.	60
9	Inoculación intramamaria y procesamiento del tejido.	84
10	Representación de la detección de biofilm en placa de poliestireno de cepas provenientes de IIM clínicas.	95
11	Representación de la detección de biofilm en placa de poliestireno de cepas provenientes de IIM subclínicas y de la cepa 110 proveniente de IIM clínica.	96
12	Representación de las medias de las absorbancias obtenidas del cultivo en placas de poliestireno de los aislados de <i>S. aureus</i> provenientes de IIM clínicas, del control negativo (-) y del control positivo (cepa V329 de <i>S. aureus</i>).	96
13	Representación de las medias de las absorbancias obtenidas del cultivo en placas de poliestireno de los aislados de <i>S. aureus</i> provenientes de IIM subclínicas, del control negativo (-) y del control positivo (cepa V329 de <i>S. aureus</i>).	97
14	Imagen representativa que muestra la identificación molecular de siete aislados de <i>S. aureus</i> por amplificación de un fragmento específico de especie de 108 pb.	98
15	Dendrograma de los 15 aislamientos de <i>S. aureus</i> provenientes de IIM clínicas n°: 17, 358, 364, 110, 48, 14, 322, 117, 293, 61, 25, 247, 133, 3 y 8.	99
16	Dendrograma correspondiente a los 21 aislamientos de <i>S. aureus</i> provenientes de IIM subclínicas n°: 2, 5a, 20, 1570, 1595, 5b, 68, 40, 134, 5128, 316 y 5011.	100
17	Dendrograma de los 20 aislamientos de <i>S. aureus</i> n°:17, 358, 364, 110, 48, 1595, 322, 117, 293, 61, 25, 247, 133, 3, 8, 316, 5128, 5011, 14, 1570.	101

18	Valores de porcentajes de internalización celular correspondientes a los 9 aislados de <i>S. aureus</i> seleccionados.	106
19	Medias de log UFC7ml obtenidas luego de 2 horas de incubación con las MAC-T durante los ensayos de internalización, correspondientes a las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de IIM clínicas y subclínicas.	107
20	Amplificación del fragmento codificante para ARNr 16S procariota (116 pb).	108
21	Curvas de crecimiento de aislados de <i>S. aureus</i> en cultivos individuales crecidos en agitación (150 rpm) a 37°C.	114
22	Tiempos de duplicación (TD) promedios de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas en segundos (").	115
23	Puesta a punto del modelo de IIM en ratón.	116
24	Persistencia de las cepas A y B en la glándula mamaria murina.	117
25	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a las 6 hs post inoculación.	119
26	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a las 12 hs post inoculación.	121
27	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a las 24 hs post inoculación.	122
28	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a las 48 hs post inoculación.	123
29	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a las 72 hs post inoculación.	125
30	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a las 96 hs post inoculación.	126
31	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas a los 5 días post inoculación.	127
32	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas al día 7 post inoculación.	128

33	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas al día 9 post inoculación.	130
34	Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de <i>S. aureus</i> obtenidas al día 11 post inoculación.	131
35	Inmunomarcación de monocitos-macrófagos con CD14 en tejido de glándula mamaria murina (96hs pi.)	134
36	Número de monocitos-macrófagos CD14 positivos/ mm^2 en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de <i>S. aureus</i> y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos.	135
37	Inmunomarcación de linfocitos t con CD4 en tejido de glándula mamaria murina (96 hs pi).	137
38	Número de linfocitos CD4 positivos/ mm^2 en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de <i>S. aureus</i> y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos.	138
39	Inmunomarcación de linfocitos con CD8 en tejido de glándula mamaria murina (96 hs pi.) Las flechas muestran linfocitos reactivos al cromógeno utilizado.	140
40	Número de linfocitos CD8 positivos/ mm^2 en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de <i>S. aureus</i> y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos.	141
41	Inmunomarcación de linfocitos B con anti CD79 en glándula mamaria murina (264 hs post inoculación.)	143
42	Número de linfocitos CD79 positivos/ mm^2 en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de <i>S. aureus</i> y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos.	144

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el principal agente causante de mastitis bovina en Argentina y en el mundo. Esta bacteria ocasiona infecciones crónicas que generan importantes pérdidas a los productores y la industria lechera. El objetivo general de esta tesis fue investigar aspectos de la interacción patógeno-hospedador y caracterizar la respuesta inmune inducida, durante la infección mamaria experimental en un modelo murino, con cepas de *S. aureus* seleccionadas según criterios clínicos, epidemiológicos, fenotípicos y genotípicos que permitan establecer diferencias y asociaciones entre las mismas. Se realizaron ensayos *in vitro* en células epiteliales mamarias bovinas a los fines de estudiar la interacción patógeno-hospedador. Por otra parte, se realizaron ensayos *in vivo* desarrollando un modelo de mastitis en ratón a los fines de caracterizar aspectos de la respuesta inmune del hospedador frente a la infección con bacterias diferenciadas en base a su comportamiento clínico y a criterios fenotípicos y genotípicos. Los aislados procedentes de infecciones intramamarias (IIM) clínicas y subclínicas se agruparon en diferentes pulsotipos demostrando una elevada diversidad genética. La invasión al epitelio mamario y la expresión de genes de adherencia y formación de biofilm se encontró ligada a cada aislado de *S. aureus*, sin mostrar asociación con el tipo de infección establecida en la glándula mamaria bovina. Las velocidades de crecimiento en cultivo se asociaron con las características de la IIM. La respuesta inmune del hospedador fue diferente para cada cepa evaluada reflejando el comportamiento clínico observado en bovinos. Los resultados obtenidos aportan nuevos conocimientos sobre la interacción patógeno-hospedador a nivel de la glándula mamaria y pueden ser de utilidad al momento de planificar la formulación de compuestos inmunoprolácticos contra la mastitis bovina.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the major causative agent of bovine mastitis in Argentina and the world. This microorganism causes chronic infections that generate significant losses to farmers and the dairy industry. The overall objective of this thesis was to investigate aspects of the host-pathogen interaction and characterize the induced immune response during experimental mammary infection in a mouse model, with strains of *S. aureus* selected based on clinical criteria, epidemiologic, phenotypic and genotypic that establishes differences and associations between them. In vitro assays were performed on bovine mammary epithelial cells in order to study the host-pathogen interaction. Moreover, in vivo studies were conducted to develop a model of mastitis in mouse in order to characterize aspects of the host immune response against infection with bacteria differentiated based on their clinical behavior and genotypic and phenotypic criteria. The isolated from clinical and subclinical intramammary infections (IMI) were grouped into different pulsotypes showing a high genetic diversity. The invasion of mammary epithelium and expression of adhesion and biofilm genes was linked to each isolated of *S. aureus*, showing no association with the type of infection established in the bovine mammary gland. Rates of growth in culture were associated with the characteristics of the IMI. The host immune response was different for each strain evaluated reflecting the clinical behavior observed in cattle. The findings provide new insights into host-pathogen interactions at the level of the mammary gland and can be helpful when planning the development of immune prophylactics compounds against bovine mastitis.

1. INTRODUCCIÓN



1.1. Mastitis bovina

1.1.1. Generalidades

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria (GM) en respuesta a una agresión local al tejido mamario que puede ser de origen infeccioso, mecánico o tóxico. Sin embargo, la gran mayoría de los casos de mastitis 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 (Shalm y col., 1971).

La ocurrencia y la intensidad de un caso de mastitis dependen de numerosos factores que están asociados al animal infectado, a la bacteria patógena y al medio ambiente en que ambos se encuentren. El medio ambiente está a su vez determinado principalmente por las condiciones de manejo que se utilizan. Esta característica multifactorial convierte a la mastitis en un problema complejo que requiere un abordaje multidisciplinario (Reza, 2000; Menzies y Ramanan, 2001).

Se han descrito más de 140 microorganismos que causan mastitis, incluyendo especies de bacterias, hongos, micoplasmas y algas (Castro y col., 2006). Las infecciones por bacterias invasoras u otros microorganismos (hongos y virus) son las principales causas de la enfermedad (Wattiaux, 2001; Castro y col., 2006).

La inflamación de la GM es inducida cuando los microorganismos patógenos penetran en la ubre vía canal del pezón, superando los mecanismos defensivos y multiplicándose en el tejido mamario, dañando el órgano y alterando la composición normal de la leche (Hillerton y Berry, 2005; Castro y col., 2006). Uno de los indicadores más importantes para comprobar el estado de salud de la GM es el recuento de células somáticas (RCS) en leche, que indica la respuesta inflamatoria a una IIM (Castro y col., 2006). Cuanto, mayor es el grado de inflamación que presenta la glándula, aumenta el RCS, lo cual está asociado a una menor calidad y cantidad de leche producida (Bedolla y Ponce De León, 2008).

La constitución anatómica de la ubre, la expone constantemente a lesiones y agentes patológicos de diversos orígenes. El propósito de la respuesta inflamatoria es destruir o neutralizar al agente causal y preparar a la GM para el retorno a su función normal (Philpot y Nickerson, 2000).

1.1.2. Importancia económica

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente a la industria lechera. Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas debido a la disminución en el rendimiento de la leche (Wellenberg y col., 2002; Rabello y col., 2005), al aumento en el número de tratamientos de casos clínicos y al desecho temprano de vacas (Saran y Chaffer, 2000; Nash y col., 2003). Además, provoca problemas relacionados con la calidad de la leche y la salud pública, a causa del riesgo de la presencia de residuos en leche por el inadecuado uso de antimicrobianos para el tratamiento de casos clínicos y a la potencial emergencia de bacterias resistentes (De Vliegher y col., 2012).

A nivel mundial, las pérdidas causadas por mastitis bovina son de aproximadamente 35 mil millones de pesos anuales y representa el 70 % de los gastos totales para los ganaderos lecheros (Philpot y Nickerson, 1992; Dos Santos y col., 2002; Welleberg y col., 2002). En Argentina, a pesar del avance en el control de mastitis en los últimos 15 años, la prevalencia de la enfermedad sigue siendo elevada. La media geométrica de los valores de RCS en leche de tanque, sobre un número aproximado de 6.640 tambos, entre agosto de 2012 al mismo mes de 2013, fue de 374.500 cél/ml (MinAgri, 2013). Considerando que las pérdidas económicas, solamente por menor producción, son al menos del 5% del total de leche producida, y teniendo en cuenta que la producción mensual promedio de esos establecimientos lecheros fue de 592 millones de litros se puede estimar en forma conservadora una pérdida anual cercana a los 355,2 millones de litros solamente para esos tambos. En un estudio reciente realizado sobre más de 2.000 bovinos en la cuenca lechera de Villa María (Córdoba) se encontró una prevalencia global de mastitis subclínica del 19,4 % y de mastitis clínica del 3 %; siendo la prevalencia de mastitis subclínica dos veces superior en vaquillonas respecto a vacas. Los costos totales por rodeo, representados por la sumatoria de las pérdidas productivas por mastitis subclínica (elevado RCS), mastitis clínica y gastos de control, fueron promediados en \$559/día y, expresado por cada vaca en ordeño, de \$4,3/vaca/día (Larriestra y Vissio, 2012).

1.1.3. Formas de manifestación

La mastitis bovina puede clasificarse en clínica y subclínica dependiendo de la presencia de signos evidentes de enfermedad (Dos Santos y col., 2002; Castro y col.,

2006) y en crónica, aguda e hiperaguda dependiendo de la persistencia del patógeno y de la severidad con que la ubre reaccione ante el agente infeccioso (Reza, 2000).

A la **mastitis clínica** se la reconoce por su aparición repentina y por los cambios macroscópicos en la ubre y/o en la leche (Tollersrud y col., 2000; Gasque Gómez, 2008). La inflamación de la glándula varía de un edema ligero a una inflamación dolorosa, caliente y consistente. La secreción de la leche disminuye y puede tener apariencia de suero sanguíneo. A menudo se evidencian signos sistémicos, como fiebre, pérdida de apetito, que en algunos casos pueden conducir a la muerte del animal (mastitis clínica hiperaguda). Su severidad varía entre estados agudos y crónicos durante el transcurso de la enfermedad (Wattiaux, 2001).

La **mastitis subclínica** no se reconoce a menos que se realice alguna de las pruebas de campo y laboratorio; como la prueba de Mastitis California, la medición de conductividad eléctrica, el conteo leucocitario en leche, la prueba de Mastitis Wisconsin, pruebas químicas (detección de albúmina, cloro, proteína, lactosa y globulina) y pruebas microbiológicas en muestras de leche (Gasque Gómez, 2008). Dado que la enfermedad transcurre sin provocar una inflamación glandular visible, ni cambios organolépticos de la leche, es difícil detectarla (Castro y col., 2006). Sin embargo, el RCS en la leche se encuentra elevado, al igual que el número de microorganismos. Esto se encuentra acompañado de una disminución del nivel de producción de la secreción láctea, así como de la alteración de la composición de dicho producto (Heringstad y col., 2000).

La reducción en la capacidad de síntesis y secreción de la GM en las mastitis subclínicas es responsable del 70 % (Philpot y Nickerson, 1992) al 75 % (NMC, 1996) del total de las causas de pérdidas; mientras que el resto de las mermas económicas son ocasionadas por la mastitis clínica. Los animales con mastitis subclínica son reservorios de microorganismos patógenos y pueden contagiar a otras vacas sanas y en algunos casos el estado subclínico puede volverse clínico (Wattiaux, 2001; Hillerton y Berry, 2005). Este tipo de manifestación es el que causa mayores perjuicios a los productores lecheros debido a su elevada prevalencia y carencia de síntomas evidentes, lo que contribuye a que animales asintomáticos actúen como reservorios de la enfermedad y contribuyan a la rápida propagación de la bacteria dentro del rodeo (Bradley y col., 2007).

Además, según la persistencia de la infección, ésta puede clasificarse en:

Aguda: corto plazo o transitoria, con cura o reversión espontánea de la enfermedad.

Crónica: largo plazo, infección persistente. La etapa terminal consiste en la atrofia de la glándula.

1.1.4. Principales patógenos causantes de mastitis

Se han identificado al menos 140 especies de microorganismos como agentes etiológicos de mastitis bovina (hongos, micoplasmas, algas, entre otros) (Watts, 1988); sin embargo entre los más comunes se encuentran las bacterias. Dependiendo de su hábitat principal y de su forma de transmisión, las bacterias causantes de mastitis han sido divididas en patógenos contagiosos y ambientales (Bedolla y Castañeda, 2003).

Los **patógenos ambientales** se encuentran en el ambiente donde vive la vaca; pasturas, cama, excremento, entre otros, (Smith y Hogan, 1993) y pasan a la ubre en los períodos entre ordeño. Al no estar adaptados a la GM, algunos de estos patógenos producen respuestas inflamatorias importantes que se traducen en casos de mastitis clínica que suelen durar poco tiempo. Incluyen un grupo heterogéneo donde se encuentran bacterias Gram positivas como *Streptococcus dysgalactiae* (Smith y Hogan, 1997), *Streptococcus uberis* y los estafilococos coagulasa negativos (ECN) y por otra parte, bacterias Gram negativas representadas principalmente por coliformes (Smith y col., 1985; Oliver, 1988). El reservorio primario de estos patógenos es el ambiente de la vaca, y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales puede ocurrir en cualquier momento durante la vida del animal (Zadoks, 2002). La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a los rodeos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control basado en higiene y terapia antibiótica de los patógenos contagiosos de la mastitis (Calvinho y col., 1998).

Los **patógenos contagiosos** viven y se multiplican sobre y dentro de la GM infectada, además se propagan entre cuartos de un mismo animal o de un animal a otro, principalmente durante procedimientos de ordeño poco higiénicos (Zadoks y col., 2001; Rossitto y col., 2002). Este grupo incluye: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, especies de *Mycoplasma* spp. y *Corynebacterium* spp. (Djabri y col., 2002; Tenhagen y col., 2006; Smulski y col., 2011).

Esta clasificación clásica es de uso muy difundido, aunque la evidencia más reciente sugiere que muchos patógenos ambientales pueden comportarse como

contagiosos y viceversa, aportando un grado más de complejidad al abordaje de esta enfermedad.

1.2. Mastitis por *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria inmóvil Gram positiva, esférica y usualmente agrupada en racimos, anaerobia-aerobia facultativa, no esporulada, catalasa positiva. Esta bacteria produce generalmente la enzima coagulasa, fermenta el manitol u otros azúcares, formando ácido pero no gas (Kloos y col., 1986). Su crecimiento ocurre en un amplio rango de temperaturas (6.5 a 50°C), siendo su temperatura óptima 30-40°C. *Staphylococcus aureus* tolera altas concentraciones de cloruro de sodio (Figura 1). Se destruye fácilmente por altas temperaturas y por casi todos los agentes desinfectantes, por lo cual la presencia de esta bacteria en alimentos procesados o en equipos indica generalmente higiene deficiente o contaminación post proceso por causa humana (Todar, 2011).

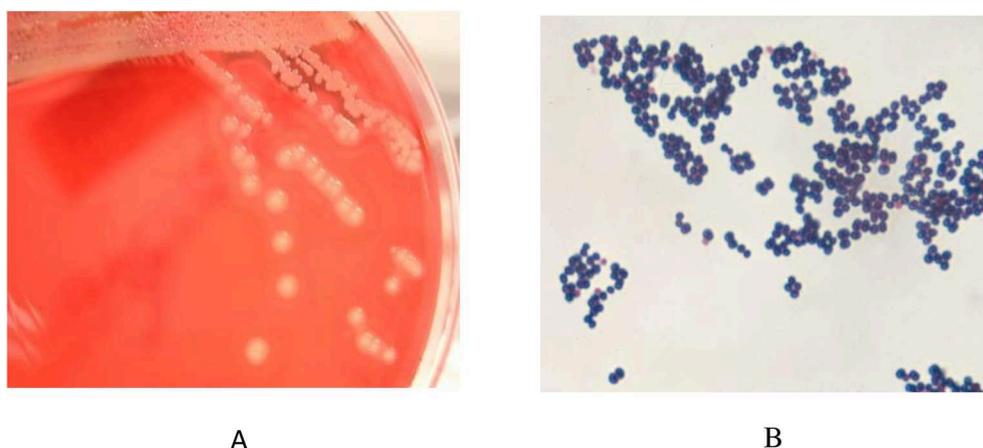


Figura 1: Colonias y características morfológicas de *Staphylococcus aureus*. (A) Crecimiento de *S. aureus* en placa de agar sangre. Colonias doradas y β -hemolíticas características de *S. aureus*. (B) Tinción de Gram de *S. aureus*. Se observan cocos dispuestos en tétradas y en racimos característicos del género *Staphylococcus*. Adaptado de González (2013).

Dentro de los patógenos contagiosos de mastitis, *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de mayor prevalencia tanto en Argentina (Calvinho y Tirante, 2005), como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi y col., 2005). Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la

forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con recuentos elevados de células somáticas y persistencia de las bacterias en la GM (Bardiau y col., 2014).

Debido a que la mayoría de las IIM causadas por *S. aureus* son subclínicas, con frecuencia no son detectadas. Clásicamente, *S. aureus* se ha caracterizado como un patógeno extracelular (Finlay y Cossart, 1997). Sin embargo, un número creciente de estudios ha demostrado la habilidad de *S. aureus* de invadir y sobrevivir dentro de varios tipos celulares del hospedador, incluyendo células epiteliales mamarias (CEM), neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000), lo cual contribuye a su persistencia en numerosas enfermedades en animales y seres humanos (Gresham y col., 2000). Estas particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario. En este sentido, las mastitis por *S. aureus* producen más daño al tejido mamario que las causadas por otros microorganismos contagiosos y pueden generar disminuciones en la producción láctea hasta de un 45% por cuarto infectado y un 15% por animal (Roberson, 1999).

La infección de la GM ocurre generalmente por vía ascendente. Los microorganismos pasan a través del canal del pezón hacia la cisterna del mismo y pueden en consecuencia establecerse en un área de tejido secretorio (Anderson, 1983). Al comienzo se verán dañadas sólo pequeñas áreas del cuarto afectado, con pérdida funcional de los alvéolos involucrados. Las células epiteliales que revisten los alvéolos y pequeños conductos mamarios degeneran, mueren y son descamadas. Este material, más los leucocitos y la fibrina producen coágulos que bloquean los conductos mayores, impidiendo la remoción de la leche que proviene de áreas aún funcionales. La leche acumulada, que no puede ser drenada trae al menos dos consecuencias negativas: 1) regresión prematura del tejido secretor por aumento de la presión intramamaria y por los efectos inhibidores del factor proteico inhibidor de la secreción de leche (FIL); esta regresión puede ser permanente sin recuperación de la funcionalidad del tejido por el resto de la lactancia y 2) la leche residual “atrapada” se transforma en un medio de cultivo ideal para que progrese la infección. Los conductos cerrados pueden reabrirse, liberando bacterias a otras partes del cuarto infectado. Este proceso se repite una y otra vez en cuestión de días o semanas, perpetuando un ciclo continuo de infecciones en áreas vecinas. Durante los estadios tempranos, el daño tisular es mínimo y generalmente

reversible. Si las bacterias sobreviven, los microabscesos irán aumentando de tamaño hasta hacerse clínicamente palpables. El curso crónico de la mastitis por *S. aureus* implica destrucción de alvéolos, oclusión de conductos galactóforos y regresión del epitelio alveolar, que es reemplazado por tejido fibroso afuncional (Corbellini, 1996; Akers y Nickerson, 2011). Este tipo de infecciones usualmente responden en forma deficiente a los tratamientos antimicrobianos lo que se traduce en graves pérdidas económicas para el productor.

Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* se adhiere a la CEM y a componentes de la matriz extracelular y posteriormente la invade. La adhesión es un requisito previo y un paso temprano crucial para la infección de la GM. *Staphylococcus aureus* puede escapar del interior del fagosoma al citoplasma de la CEM e inducir la apoptosis (Bayles y col., 1998). En vacas crónicamente infectadas, se ha demostrado la presencia de *S. aureus* viables en el interior de macrófagos y en células alveolares aisladas de leche (Hebert y col., 2000). Por lo tanto, la infección subclínica repetida puede resultar de la existencia intracelular de la bacteria preservada de las defensas del hospedador así como del efecto de los antibióticos.

El desarrollo de la IIM y la respuesta de los tejidos a la presencia de *S. aureus* dependen no solo de la efectividad de los mecanismos de defensa del hospedador sino también del índice de multiplicación del microorganismo y el tipo y concentración de los factores de virulencia bacterianos (Fournier y col., 2008). Estudios recientes han demostrado la asociación entre genotipos y factores de virulencia de *S. aureus* con las manifestaciones clínicas y comportamiento epidemiológico de las IIM causadas por este microorganismo, que ponen en perspectiva atributos que favorecerían la persistencia de las infecciones mamarias (Haveri y col., 2007; 2008; Fournier y col., 2008; Piccinini y col., 2010; 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, las interacciones entre microorganismos, sistema inmune del hospedador y factores ambientales pueden modular el progreso o resolución de la enfermedad (Piccinini y col., 2012).

El patrón de IIM causadas por *S. aureus* difiere frecuentemente entre rodeos y estas diferencias podrían estar relacionadas con distintas características de las cepas (Zecconi y col., 2005; 2006), aunque otros estudios sugieren que solo pocos clones estarían involucradas en el desarrollo de la mastitis bovina (Akineden y col., 2001; Zecconi y col., 2006, Buzzola y col., 2007). La importancia de evaluar la combinación de factores de virulencia de *S. aureus* se ha enfatizado recientemente tanto en medicina humana como en veterinaria (Haveri y col., 2005; 2007; Le Maréchal y col., 2011;

Melchior y col., 2011, Szweda y col., 2012; Bardiau y col., 2014) y los resultados obtenidos avalan la teoría de que el progreso de la IIM hacia la resolución o hacia la cronicidad podría estar relacionado con las características de la cepa y con la expresión de combinaciones específicas de factores de virulencia.

1.2.1. Estructura y factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus posee una pared celular compuesta por una gruesa capa de péptidoglicano asociada a ácidos teicoicos, proteínas estructurales y otros compuestos (Castro y col., 2006). La membrana celular es una estructura bilaminar convencional, en cuya capa más externa se encuentran anclados ácidos lipoteicoicos unidos por un puente disacárido a un glicolípido (Murray y col., 2005).

El crecimiento y la supervivencia de esta bacteria dependen de su capacidad para adaptarse a los cambios del medio ambiente. Es por ello que *S. aureus* ha desarrollado diversos mecanismos para superar esos cambios, sobre todo en una infección. Durante la fase exponencial del crecimiento, el metabolismo de estas bacterias es rápido y eficiente para garantizar un crecimiento constante. A medida que transcurre el tiempo dejan de multiplicarse y el metabolismo celular se reorganiza para la supervivencia a largo plazo bajo condiciones desfavorables (Harris y col., 2002).

La mayoría de las infecciones causadas por *S. aureus* se deben a sus múltiples factores de virulencia. Estos actúan de manera coordinada para promover la infección, lo que dificulta el estudio del rol preciso que cumple cada factor en la patogenia de las IIM (Zecconi y Scali, 2013). Sin embargo, se han descrito correlaciones entre cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina y la expresión de determinados factores de virulencia, lo cual permite inferir sobre el modo en que estos factores contribuyen al desarrollo de la infección (Melchior y col., 2011, Szweda y col., 2012; Bardiau y col., 2014).

En estudios previos sobre IIM persistentes se ha observado que las cepas bacterianas que causan este tipo de infección difieren de las que causan infecciones transitorias. Estas diferencias entre cepas fueron estudiadas usando técnicas de tipificación molecular descriptivas (Haveri y col., 2007; 2008; Founier y col., 2008; Graber y col., 2009; Ote y col., 2011), encontrándose además, diferencias funcionales en ensayos *in vitro*. Estos ensayos funcionales incluyeron adhesión e invasión a las CEM (Tuchscher y col., 2005; Buzzola y col., 2007; Bardiau y col., 2014) y dinámica del crecimiento bacteriano en macrófagos mamarios (Lewandowska-Sabat y col., 2013).

Por su parte, Schukken y col. (2011) sugieren que la adaptación de las cepas dominantes al hospedador daría lugar a infecciones asociadas con patrones de enfermedad clínicamente menos severa y mayor oportunidad de permanencia y transmisión en el rodeo. Dado que diferentes cepas de *S. aureus* utilizan estrategias de infección y supervivencia únicas, se ha teorizado que la respuesta inmune del hospedador también variará de acuerdo con la cepa infectante (Kim y col., 2011).

Entre la gran variedad de factores de virulencia, *S. aureus* produce toxinas extracelulares (α , β , γ y δ hemolisinas, enterotoxinas, leucocidina), enzimas (estafiloquinasas, lipasas, esterases, proteasas, nucleasas), proteínas asociadas a la pared celular (proteína A, proteína de unión a colágeno, proteína de unión a fibronectina, proteína de unión a fibrinógeno, proteína de unión a elastina), polisacáridos capsulares (PC) y biofilm (Garzoni y Kelley, 2009). Durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferencialmente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase post logarítmica. Se ha propuesto que, esta expresión bifásica de los factores de virulencia cumpliría con la función de organizar el proceso de infección. Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del hospedador facilitando la colonización, seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas y enzimas (Lowy, 1998). Sin embargo, se ha postulado que para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador, para lo cual regularía negativamente la expresión de factores de virulencia. Esta fina red regulatoria sería la clave en la patogénesis de la infección crónica por *S. aureus*, permitiendo la adaptación del microorganismo a los cambios del microambiente durante el curso de la infección, y su supervivencia y persistencia intracelular (Tuchscherer y col., 2010).

En la última década numerosos genes de virulencia de *S. aureus* (*spa* IgG-binding, *spa* X-región, *nuc*, *clfA*, *clfB*, *coa*, *hla*, *hly*, *fnbA*, *fnbB*, *cap*, *agrI*, *agrII*, *agrIII*, *icaA*, *icaD*, *icaC*, *bap*) han sido descritos en aislamientos provenientes de mastitis bovina (Haveri y col., 2007; Reinoso y col., 2008; Bardiau y col., 2014). Además, ciertos genes pueden estar asociados con determinantes de resistencia a antimicrobianos (*mecA*, *blaZ*) e hipervirulencia (genes que codifican Pantón-Valentine leucocidina) (Haveri y col., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que *S. aureus* posee diferentes habilidades para colonizar el tejido y diseminarse dentro de la GM y que estas diferencias son debidas a la expresión de los factores de virulencia (Zecconi y col., 2006; Fournier y col., 2008;

Piccinini y col., 2010; 2012; Klein y col., 2012), los cuales influyen en la difusión en el rodeo. Considerando estos antecedentes, para lograr avances futuros en el control de la mastitis bovina por *S. aureus*, los estudios deberían enfocarse en incrementar los conocimientos sobre las cepas específicas que causan infecciones persistentes en el rodeo.

1.2.1.1. Adhesinas

La adhesión representa una fase fundamental en la patogénesis de *S. aureus*, donde este patógeno expresa una amplia variedad de moléculas que colaboran en el proceso, denominadas adhesinas (Zecconi y Scali, 2013). Estas moléculas median la adhesión a diferentes sustratos en el hospedador. Estas proteínas de adherencia están involucradas en el proceso infeccioso temprano, son expresadas en la superficie del organismo patógeno y se consideran moléculas importantes bajo el punto de vista inmunológico (Foster, 2005) resultando blancos interesantes para el desarrollo de futuras vacunas.

Como se ha mencionado, *S. aureus* expresa un amplio rango de factores de virulencia, incluyendo proteínas de la superficie que se unen en forma covalente a los péptidoglicanos, las cuales son conocidas como proteínas de unión a la pared (del inglés: cell wall-anchored, CWA). Estas proteínas de superficie son cruciales para el éxito del microorganismo como comensal o como patógeno. Foster y col. (2014) en una reciente revisión, proponen dividir a las CWA en cuatro grupos sobre la base de la presencia de motivos que se han definido en base al análisis de la estructura y función. El grupo más prevalente son las adhesinas que pueden estar ancladas en la superficie de la bacteria definidas como "Componentes de la Superficie Microbiana que Reconocen Moléculas Adhesivas de la Matriz" bajo las siglas en inglés MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Entre ellas se encuentran las proteínas de unión a fibronectina A y B (FnBP-A, FnBP-B), la proteína A (SpA), factor de agregación (Clumping factor, Clf) A y B (ClfA y ClfB), entre otras (Joh y col., 1999). Otro grupo de adhesinas son las designadas SERAMs (secretable expanded repertoire of adhesive molecule). Estas proteínas poseen la capacidad de ser secretadas al medio y luego volver a unirse a la superficie bacteriana. A este grupo pertenecen la proteína de unión a la matriz extracelular (Emp), adhesina de unión a colágeno (Cna), proteína de unión al fibrinógeno extracelular (Efb) y proteína de adherencia extracelular (Eap) (Nitsche-Schmitz y col., 2007).

La Figura 2 resumen las funciones principales de las proteínas de unión a la pared (CWA) de *S. aureus*, entre las cuales se incluye a las MSCRAMMs, y su contribución a la evasión de la respuesta inmune del hospedador.

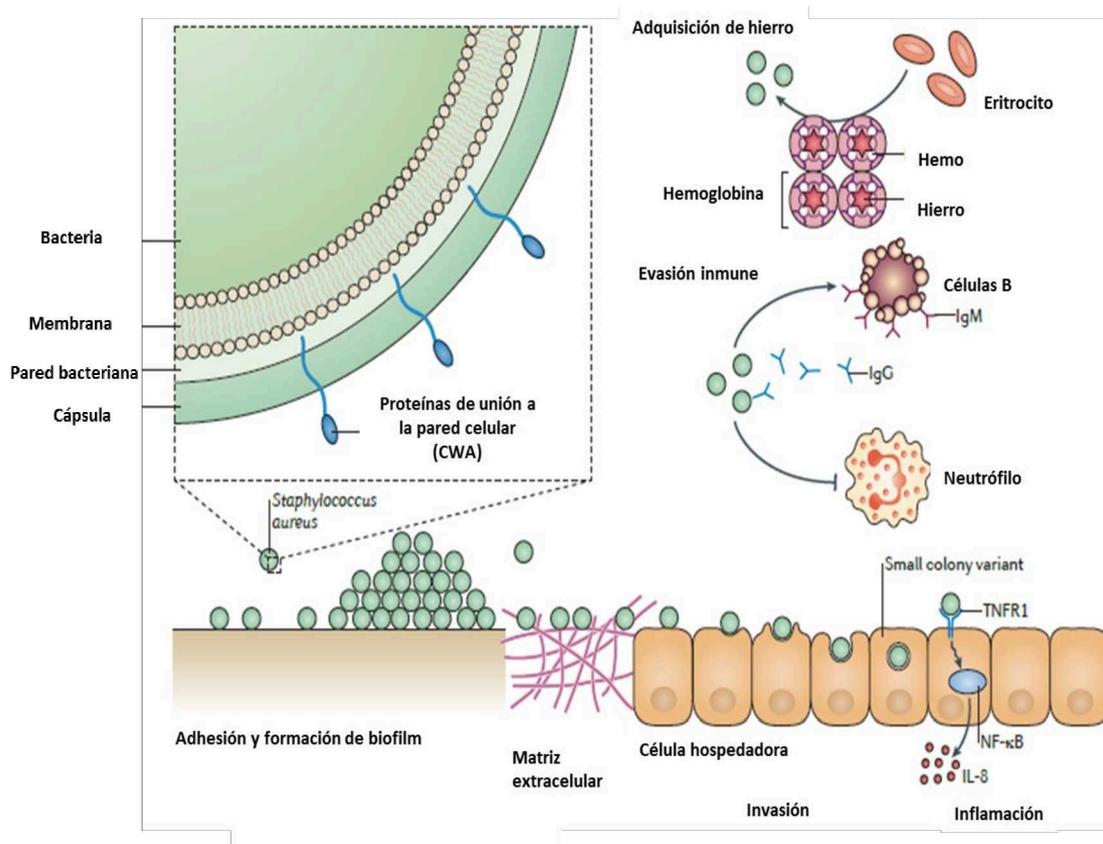


Figura 2: Funciones de las proteínas de unión a la pared celular (CWA) de *S. aureus*. Las proteínas de unión a la pared celular (CWA), que se encuentran reguladas por hierro, se unen a la hemoglobina y transportan el grupo hemo a través de la pared celular y la membrana al citoplasma, donde el hierro queda libre. La Proteína A actúa como un superantígeno para los linfocitos B y altera la respuesta inmune adaptativa y la memoria inmunológica. La fagocitosis por los neutrófilos es inhibida por la unión de proteínas CWA a la IgG mediante la reducción del nivel de receptores de neutrófilos a la opsonina C3b del complemento. Las proteínas CWA promueven la adhesión de *S. aureus* a la matriz extracelular. Las interacciones entre proteínas CWA sobre las células adyacentes contribuyen a la fase de acumulación de la formación de biopelículas. Las Proteínas CWA interactúan directa o indirectamente con las integrinas y promueven la invasión a las células hospedadoras. Las bacterias intracelulares pueden causar la apoptosis o necrosis de la célula hospedadora o pueden entrar en un estado de reposo como el de las bacterias conocidas como “small colony variants” de *S. aureus*. Mediante la unión y la activación al receptor TNFR1 en las células epiteliales, la proteína A desencadena la síntesis de citoquinas como IL-6 y el factor de transcripción nuclear- κ B causando inflamación, lo que contribuye a la patogénesis (Adaptado de Foster y col., 2014).

Por otra parte, *S. aureus* puede valerse de adhesinas para interactuar con proteínas extracelulares del hospedador como ser: colágeno (Holderbaum, 1986) fibronectina, fibrinógeno, entre otras (Fowler y col., 2000). Una vez que el patógeno invadió la GM, debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente. Es por ello que la adherencia, supervivencia y multiplicación de *S. aureus* en el epitelio mamario son

eventos tempranos decisivos en la patogénesis de la infección. Este comportamiento protegería al patógeno de la respuesta inmune innata del hospedador y del tratamiento con antibióticos y contribuiría a su persistencia en el tejido mamario (Hebert y col., 2000).

Proteínas de unión a fibronectina (FnBP)

A pesar de la presencia de numerosas adhesinas en el microorganismo, la patogénesis estaría relacionada esencialmente con la expresión de proteínas de superficie de unión a fibronectina (fibronectin binding proteins (FnBP) (Fowler y col., 2000). Las proteínas FnBP-A y FnBP-B están codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB* localizados en tándem en el cromosoma, y se encuentran ancladas a la pared celular de *S. aureus*. Cada FnBP posee tres copias de un motivo D, llamadas D1, D2 y D3. Cada dominio D puede unirse individualmente a fibronectina (Fn) aunque con baja afinidad, pero al disponerse en tándem conforman un dominio de unión D1-3 de alta afinidad (Jonsson y col., 1991) ($K_d = 51.8 \text{ nM}$), de modo que la reacción es prácticamente irreversible bajo condiciones fisiológicas (Maxe y col., 1986). Adicionalmente, la interacción indirecta de FnBP-A con integrinas $\alpha_5\beta_1$ de la célula hospedadora desencadena eventos de señalización intracelular, reorganización de moléculas de actina e internalización de la bacteria a través de mecanismos que dependen enteramente de las células hospedadoras (Dziewanowska y col., 1999) (Figura 3).

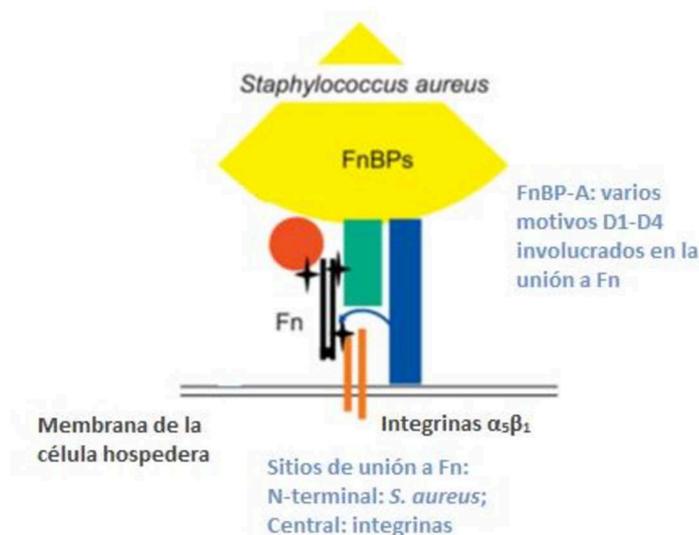


Figura 3: Modelo del mecanismo de invasión de *S. aureus*. Las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) de *S. aureus* se unen a través de fibronectina (Fn) de la célula hospedadora como molécula puente con los principales receptores celulares de Fn, las integrinas $\alpha_5\beta_1$. Esto conduce a la reorganización de la actina-F y a la invasión de la célula hospedadora. Adaptado de Sinha y col. (2010).

Aquellas cepas que no expresan estas proteínas presentan una reducción importante en la capacidad de invasión in vitro a células del epitelio mamario bovino; mientras que cepas con mutaciones en genes que codifican otras proteínas de superficie (clumping factor y proteína A) se internalizan sólo con una eficiencia levemente menor (Dziewanowska y col., 1999). En un estudio realizado con una mutante isogénica de *S. aureus* deficiente en ambas FnBPs, se observó una disminución del 40% en la capacidad de esta cepa de adherirse a una línea de células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), comparado con la cepa salvaje (Dziewanowska y col., 1999). Otro factor importante en el mecanismo de adherencia sería la existencia de Fibronectina (Fn) sanguínea. Fowler y col. (2000) observaron que, al enfrentar *S. aureus* a una línea celular de ratón en presencia de suero fetal bovino carente de Fn, el nivel de invasión se redujo considerablemente, comparado con el uso de suero fetal bovino completo. En un estudio posterior, Brouillette y col. (2003) utilizaron un modelo de mastitis en ratón para evaluar una cepa de *S. aureus* mutante carente de los genes *fnbA* y *fnbB* y una salvaje. La presencia de las FnBPs en la cepa salvaje incrementó la capacidad bacteriana de colonizar las GMs, aún bajo la presión ejercida por el amamantamiento, comparada con la cepa mutante.

Otro hecho que resalta la importancia de estas moléculas en la patogénesis de la infección por *S. aureus* es su presencia en la mayoría de las cepas de origen bovino. En un estudio realizado en Bélgica a partir de 229 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina, la amplificación del gen codificante para la FnBP-A resultó positiva en el 84% (Ote y col., 2011). En un estudio realizado en el sur de Brasil con 85 cepas aisladas de casos de mastitis subclínicas, el 63,5% poseía los genes *fnbP*, y de ellos, 9 seleccionados al azar presentaron una alta expresión durante la fase de crecimiento exponencial in vitro, en estudios de PCR cuantitativa (Klein y col., 2012).

Proteína de unión al fibrinógeno (Clf)

Uno de los factores de virulencia más valiosos para *S. aureus* es el receptor de fibrinógeno de superficie celular o también denominado factor de agregación (Clumping factor, Clf), su nombre se debe a la interacción con el fibrinógeno plasmático conduciendo a una aglomeración instantánea de las células bacterianas (Ote y col., 2011; Klein y col., 2012). Se sabe que el mismo, incrementa la virulencia estafilocócica en modelos de infección animal (Moreillon, y col., 1995). Además se encuentra presente

en la mayoría de las cepas de *S. aureus* humanas y bovinas (Gonano y col. 2009; Ote y col., 2011; Klein y col., 2012)

Se han descrito dos factores de agregación, ClfA y ClfB. El ClfB se une a las cadenas α y β del fibrinógeno, mientras que el ClfA solo reaccionaría con la cadena γ (McDevitt y col., 1997; Ní Eidhin y col., 1998). Se ha sugerido que el gen *clfB* se expresa sólo durante la fase temprana de crecimiento exponencial y que luego sería degradado de la superficie por proteasas bacterianas (Ní Eidhin y col., 1998), mientras que el *clfA* estaría presente en todo el ciclo de crecimiento (Hartford y col., 1997). Sin embargo, en un estudio reciente realizado en un modelo murino de bacteriemia e infección de herida con diferentes cepas de *S. aureus* se demostró que la expresión del *clfA* es heterogénea y dependiente tanto del microambiente de infección como de la cepa utilizada (Nanra y col., 2009). A diferencia de la mayoría de las proteínas de la superficie, que se expresan predominantemente durante la fase exponencial, el gen *clfA* se mantiene activo en la fase estacionaria de crecimiento. En la Figura 4 se muestran las principales proteínas secretadas y de superficie de *S. aureus*.

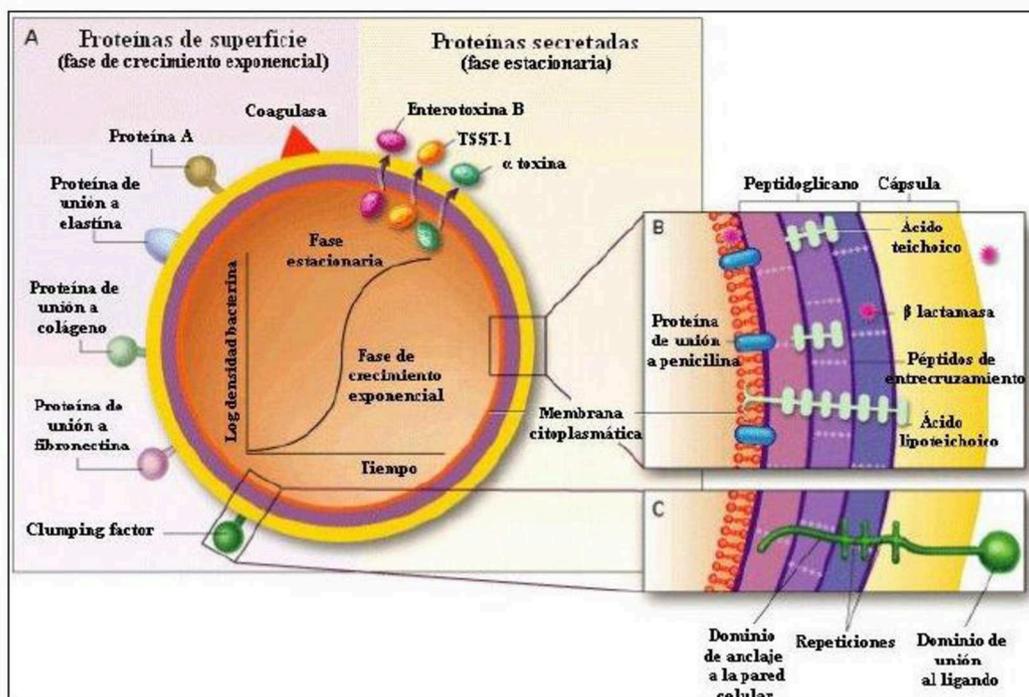


Figura 4: Estructura de *S. aureus*. A. Superficie de la bacteria con sus proteínas secretadas y de superficie. La síntesis de varias de las proteínas depende de la fase de crecimiento. B y C. Sección transversal de la envoltura de la célula (Franklin y Lowy, 1998).

Proteína A (Spa)

Entre los factores de virulencia expresados por *S. aureus*, la proteína A (SpA) es una molécula conservada de la superficie de 42-kDa presente en el 50-60% de las cepas aisladas de IIM bovinas (Sutra y Poutrel, 1994) y juega un rol muy importante en la patogenia. SpA consiste de 5 dominios conservados localizados en la región amino terminal, seguido, en la porción carboxi terminal, por una región polimórfica llamada Xr, que contiene un número variable (1-22) de 24 pb de secuencias repetidas cortas (SSRs). Este polimorfismo ha sido extensivamente usado como una herramienta en epidemiología para la tipificación molecular de *S. aureus* (Shopsin y col., 1999; Hwang y col., 2010). SpA ha sido reconocida como un factor de virulencia de *S. aureus* en base a su presunta propiedad antifagocítica atribuida a su habilidad para unirse al componente Fc de la IgG impidiendo la unión de la bacteria a receptores específicos de las células del sistema inmune (Foster, 2005). Asimismo, se ha demostrado que SpA ejerce otros importantes roles tales como, activación de plaquetas (Hartleib y col., 2000), estimulación de la proliferación de linfocitos B (Graille y col., 2000), e inducción de inflamación por su habilidad para activar las cascadas de señalización de TNF- α e IFN- β (Gomez y col., 2004; Martin y col., 2009). La gran variabilidad en el número de SSRs de SpA en aislamientos clínicos de *S. aureus* ha sugerido un papel potencial para la región Xr en la patogénesis de la infección crónica. Trabajos recientes han postulado que la reducción en el número de SSR de la región polimórfica del gen que codifica la SpA, podría asociarse con un posible mecanismo de evasión empleado por *S. aureus* para persistir en el hospedador. En este sentido, un número bajo de SSR (<7) en cepas aisladas de humanos se ha asociado en forma significativa con osteomielitis crónica, observándose una relación inversa entre el número de secuencias repetidas y la duración de la evolución de la infección crónica (Garofalo y col., 2012). Sin embargo, la importancia de este mecanismo en las IIM en bovinos no está dilucidada.

1.2.1.2. Polisacáridos capsulares

Staphylococcus aureus produce PC tanto in vivo como bajo condiciones definidas de cultivo (Stringfellow y col., 1991; Lee y col., 1993). Estos PC son importantes en la patogénesis de infecciones estafilocócicas y han sido postulados como uno de los principales factores de virulencia de la bacteria (O'Riordan y Lee, 2004).

Se han descrito 11 serotipos, pero sólo los polisacáridos de los serotipos 1, 2, 5 y 8 han sido purificados y caracterizados químicamente (O'Riordan y Lee 2004). Existen diferentes métodos para tipificar cepas de *S. aureus* según el tipo de PC que posean. Uno de los más utilizados consiste en enfrentarlas a anticuerpos policlonales o monoclonales específicos contra las cápsulas de tipo 1, 2, 5 y 8 (Karakawa y col., 1985) (Figura 5).

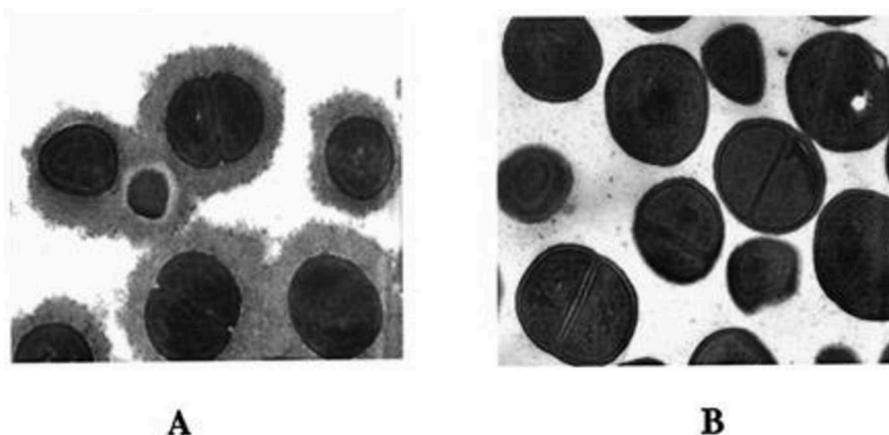


Figura 5: Micrografías de transmisión electrónica de células de *S. aureus* en fase estacionaria. Previo a la fijación, las bacterias fueron incubadas con anticuerpos específicos anti-PC5 para estabilizar y visualizar la cápsula. **A:** Cepa Reynolds productora de PC5; **B:** mutante acapsular de *S. aureus* (Schaffer y Lee, 2008).

Las cepas que no reaccionan con ninguno de estos anticuerpos se denominan no tipificables (NT), debido a que no se hallan disponibles cepas prototipos ni sus correspondientes antisueros (Guidry y col., 1994; O'Riordan y Lee, 2004; Jones, 2005). Los serotipos 1 y 2 son clasificados como altamente encapsulados, ya que dan colonias mucoides en medio sólido y son fácilmente observables por microscopía. Los serotipos 5 y 8 se denominan microcápsulas, ya que producen escaso material capsular, dando colonias no mucoides, compactas en medio sólido, que resultan indistinguibles de las colonias generadas por cepas no capsuladas (O'Riordan y Lee 2004; Sutra y Poutrel, 1994).

Los serotipos de polisacáridos capsulares 5 y 8 (PC5 y PC8) son los de mayor prevalencia en bovinos, estando asociados al 70-80% de los aislamientos (Guidry y col., 1997; Tollersrud y col., 2000). Mientras que los serotipos PC1 y PC2 son de hallazgo infrecuente (Sompolinsky y col., 1985).

Un estudio realizado en Argentina determinó que solo el 14 % de 195 aislamientos de *S. aureus* a partir de leche bovina fueron caracterizados como serotipos

PC5 o PC8 reportando una alta prevalencia de aislamientos no tipificables (NT) (Sordelli y col., 2000). Sin embargo, más del 70 % de los aislamientos pertenecía a la misma provincia, mientras que solamente el 4,6 % provenía de las dos provincias que concentran aproximadamente el 60 % de la producción lechera del país. En trabajos más recientes se demostró que la falta de expresión de PC en aislamientos de *S. aureus* se debe a mutaciones puntuales dentro de los genes esenciales que codifican la cápsula, ya sea en las regiones promotoras, en los genes reguladores de la producción de cápsula, o también por supresión del locus *cap5(8)* (Cocchiaro y col., 2006). En este último caso, se observó que dicho locus se sustituía por un elemento o secuencia de inserción (IS) denominado IScap, el cual posee un 93% de identidad con IS257 (Tuchscher y col., 2007). En un estudio reciente se evaluó por PCR la presencia de los loci capsulares *cap5* y *cap8* en 157 *S. aureus* aislados de mastitis clínicas y subclínicas registradas en las provincias de Santa Fe (n=91), Buenos Aires (n=31), Córdoba (n=22) y Entre Ríos (n=13). El 64 % de los aislamientos pudo genotipificarse donde el 53 % resultó PC5 y el 11 % PC8. Además, al evaluar fenotípicamente la presencia de PCs, se observó que el 50 % de los aislamientos con genotipo *cap5* o *cap8* eran capaces de producirlo *in vitro* (Camussone y col., 2012).

La producción de PC por *S. aureus* enmascara los anticuerpos dirigidos contra componentes de la pared celular e impide el mecanismo de activación por complemento, por lo cual las cepas capsuladas son más resistentes a la fagocitosis (Paape y col., 2003). De este modo los PC dificultan la eliminación de la bacteria e incrementan su habilidad para diseminarse y sobrevivir en el torrente sanguíneo y tejidos (O'Riordan y Lee, 2004). La activación del complemento se ve impedida debido a la disminución en la unión de los fragmentos de C3b en bacterias que poseen PC. El enmascaramiento de dichos fragmentos conlleva a una marcada disminución de la fagocitosis por neutrófilos (Cunnion y col., 2003). La opsonofagocitosis tampoco podría llevarse a cabo por medio de anticuerpos específicos contra moléculas de la membrana ni por la unión del complemento a receptores bacterianos, debido al impedimento estérico que presentaría la cápsula (O'Riordan y Lee, 2004). Sin embargo, anticuerpos contra la cápsula favorecerían la opsonización, la fagocitosis y subsecuentemente la eliminación de las bacterias que se encuentran dentro de los fagosomas de macrófagos humanos y bovinos (Cunnion y col., 2003, Guidry y col., 1994).

En cuanto a la influencia de la producción de la cápsula en la adherencia de *S. aureus* a las células del endotelio, se encontró que la adherencia es máxima durante la

fase logarítmica de crecimiento, cuando la producción de PC es mínima (O'Riordan y Lee, 2004). Luego, en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, la expresión del PC es máxima y la capacidad de adherencia de la bacteria disminuye, lo cual sugiere que la expresión de los PC5 y 8 enmascara a las adhesinas presentes en la superficie celular impidiendo la unión de la bacteria a las células endoteliales (O'Riordan y Lee, 2004).

Se ha demostrado que la ausencia de expresión de PC aumenta la adherencia (Pöhlmann-Dietze y col., 2000) e invasión de *S. aureus* a las células endoteliales y epiteliales mamarias bovinas in vitro (Buzzola y col., 2007; Thurlow y col., 2011; Bardiau y col., 2014). Además, se ha observado que cepas de *S. aureus* PC negativas indujeron mastitis experimentales crónicas en ratones, sugiriendo que la pérdida de la expresión de cápsula podría aumentar la persistencia de *S. aureus* en la GM (Tuscherr y col., 2005). Estos hallazgos sugieren que la modulación de la expresión de la cápsula puede ser un atributo importante de este patógeno, mejorando su capacidad de sobrevivir en una gran variedad de nichos ambientales.

La expresión de los PC5 y 8 es altamente sensible a varias señales del entorno y probablemente influenciada por el ambiente (O'Riordan y Lee, 2004). Ciertas condiciones de crecimiento bacteriano, tales como el medio de cultivo, han demostrado tener una influencia muy importante en la producción de la cápsula (Dassy y col., 1991; Poutrel y col., 1995).

El crecimiento de *S. aureus* bajo concentraciones limitantes de hierro y en medio sólido aumenta la producción de PC8 (Lee y col., 1993). El incremento en la producción del tipo capsular 5 fue observado bajo condiciones de elevada tensión de oxígeno, pero se redujo bajo condiciones alcalinas de crecimiento o en presencia de extracto de levadura (Dassy y col., 1991; Stringfellow y col., 1991; Herbert y col., 1997). La producción de cápsula in vitro se incrementa con el crecimiento de las bacterias en leche (Sutra y col., 1990) o en medios suplementados con cloruro de sodio (Pohlmann-Dietze y col., 2000). Sin embargo, no se ve afectada por cambios en el contenido de fosfatos en el medio (Fox y col., 1998).

Se ha determinado que el dióxido de carbono regula la expresión del PC5 tanto in vivo como in vitro (Herbert y col., 1997). Aunque PC5 fue expresado bajo condiciones normales de oxígeno, la expresión de éste por 3 cepas diferentes serotipo 5 fue inhibida cuando se cultivaron en atmósfera suplementada con CO₂ (Herbert y col., 1997). En contraste, la detección cuantitativa del PC8 en diferentes cepas de *S. aureus* cultivadas

en presencia de CO₂ generó resultados conflictivos; algunas cepas desarrollaron mientras que otras se vieron inhibidas (Herbert y col., 2001).

Varios estudios han demostrado la producción de cápsula in vivo (O'Riordan y Lee, 2004). Arbeit y Nelles (1987) fueron capaces de detectar PC8 en suero de ratas con endocarditis inducida por catéter provocada por una cepa de serotipo 8, pero no en el suero de los animales infectados con una cepa de serotipo 5. Por otra parte, utilizando una cepa productora de PC5, Hensen y col. (2000) pudieron detectar su presencia in vivo en infecciones mamarias bovinas tanto agudas como crónicas.

1.2.1.3. Biofilm

En la infección de la GM, *S. aureus* se localiza fundamentalmente dentro de los alvéolos y conductos lácteos en forma de conglomerados y en asociación con el tejido epitelial (Melchior y col., 2006). Estos conglomerados corresponden a un crecimiento bacteriano en forma de colonias adherentes rodeadas por una matriz de exopolisacáridos cuya estructura completa constituye el biofilm o biopelícula. Se denomina biofilm a una comunidad microbiana sésil donde las bacterias se unen a una superficie o a otras bacterias embebidas en una matriz polimérica extracelular de protección. Este modo de crecimiento produce alteraciones con respecto a la expresión génica y la producción de proteínas (Parsek y Singh, 2003; Archer y col., 2011; Kiedrowski y Horswill, 2011).

Se ha documentado que la formación de biofilm es un importante factor de virulencia de *S. aureus* que facilita la adherencia y colonización del epitelio de la GM y que constituye un medio por el cual las bacterias evaden las defensas inmunológicas del animal causando IIM persistentes en los bovinos (Cucarella y col., 2002; 2004; Melchior y col., 2006). La formación de biofilm perjudica la acción tanto del sistema inmune del hospedador, como de los agentes antimicrobianos, y por lo tanto representa uno de los mecanismos de supervivencia más importantes de bacterias que colonizan en forma persistente el nicho extracelular (Melchior y col., 2006). Sin embargo, varios factores del medio, así como genéticos, influyen en la formación de biofilm por parte de *S. aureus* (Bardiau y col., 2014).

A pesar del consenso general que indica que la formación de estas biopelículas conforma la base para el desarrollo de infecciones crónicas o persistentes, los conocimientos acerca del mecanismo de formación de las mismas son incompletos. En la Figura 6 se muestran las diferentes etapas en la formación de biofilm. Aparentemente la **primera etapa**, conocida como fase de acondicionamiento o etapa reversible, en la

cual se produce la interacción de las bacterias con la superficie a colonizar (Marshall y col., 1971), las mismas presentan ciertos comportamientos específicos como, por ejemplo, rodar, reptar, formación de agregados e hileras bacterianas (Lappin-Scott y col 1995) antes de comenzar a exudar material polimérico extracelular (EPS) y adherirse irreversiblemente. La **segunda etapa** (etapa de adherencia primaria o fijación irreversible) comprende la unión de las bacterias a la superficie, lo cual es facilitado por adhesinas asociadas a la pared celular (MSCRAMMs) (Cucarella y col., 2001; Toledo-Arana y col., 2001).

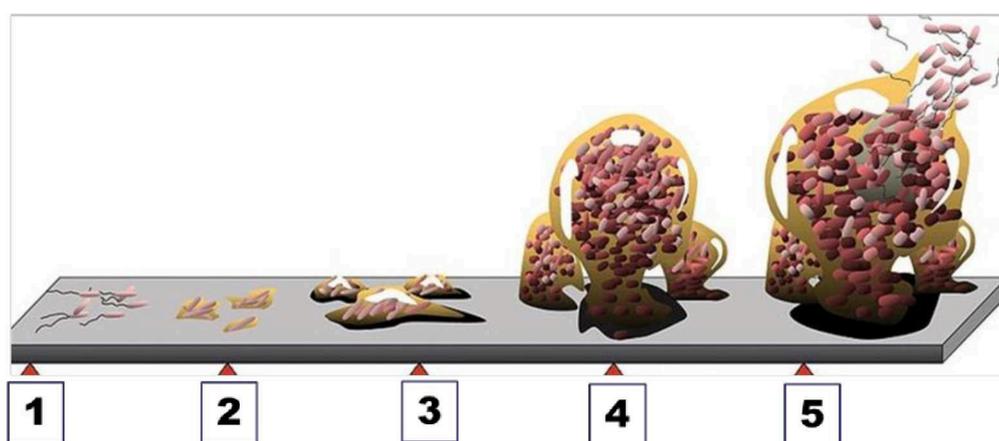


Figura 6: Etapas en el proceso de formación del biofilm. 1: unión reversible, 2: unión irreversible, 3: maduración inicial, 4: maduración final, 5: dispersión (Adaptado de Sauer, 2003).

La **tercera etapa** se caracteriza por la multiplicación celular (maduración inicial), donde las células hijas se extienden al sitio de unión formando una estructura madura compuesta por muchas capas de células, conectadas entre sí por polisacáridos extracelulares (Melchior, 2006). Uno de los principales polisacáridos constituyentes de la matriz del biofilm es poli-N-acetil β -1,6 glucosamina (polysaccharide intercellular adhesin [PIA]/PNAG), sintetizado por proteínas codificadas por el grupo de genes *icaADBC* denominado locus de adhesión intercelular (intercellular adhesion locus) (Cramton y col., 1999; Maira-Litran y col., 2002).

El operón *ica* está compuesto por los genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* y el gen represor *icaR*, donde cada gen cumple con funciones específicas en la formación del biofilm. El *icaA* contiene una secuencia señal típica que codifica para N-acetilglucosaminiltransferasa, anclada en la membrana citoplasmática, una enzima involucrada en la síntesis de oligómeros de N-acetilglucosamina a partir de UDP-N-

acetilglucosamina (Arciola, 2001), necesaria para la actividad del gen *icaD* (Götz, 2002; O'Neill, 2007). La expresión de *icaA* sólo induce una baja actividad enzimática, pero la coexpresión de *icaA* e *icaD* incrementa significativamente la actividad de la N-acetilglucosamina transferasa (Otto, 2008). Los genes *icaC* son necesarios para la exportación de la cadena nascente de PIA desde el citoplasma de la célula hasta la superficie de la pared celular bacteriana. Por otra parte, se ha demostrado que la proteína IcaB codificada por *icaB* es la responsable de la desacetilación de la molécula de PIA (Otto, 2008).

La expresión de *icaADBC* es regulada en parte por *icaR*, un miembro de la familia de proteínas regulatorias TetR. El gen *icaR* está localizado corriente arriba del operón *icaADBC*, transcribe divergentemente de *icaADBC* y codifica una proteína reguladora IcaR (represor transcripcional). IcaR se une al promotor *icaADBC*, específicamente en la porción 5' del inicio del codón *icaA*, regulando negativamente la expresión de *ica* (Jefferson y col., 2003; O'Gara, 2007).

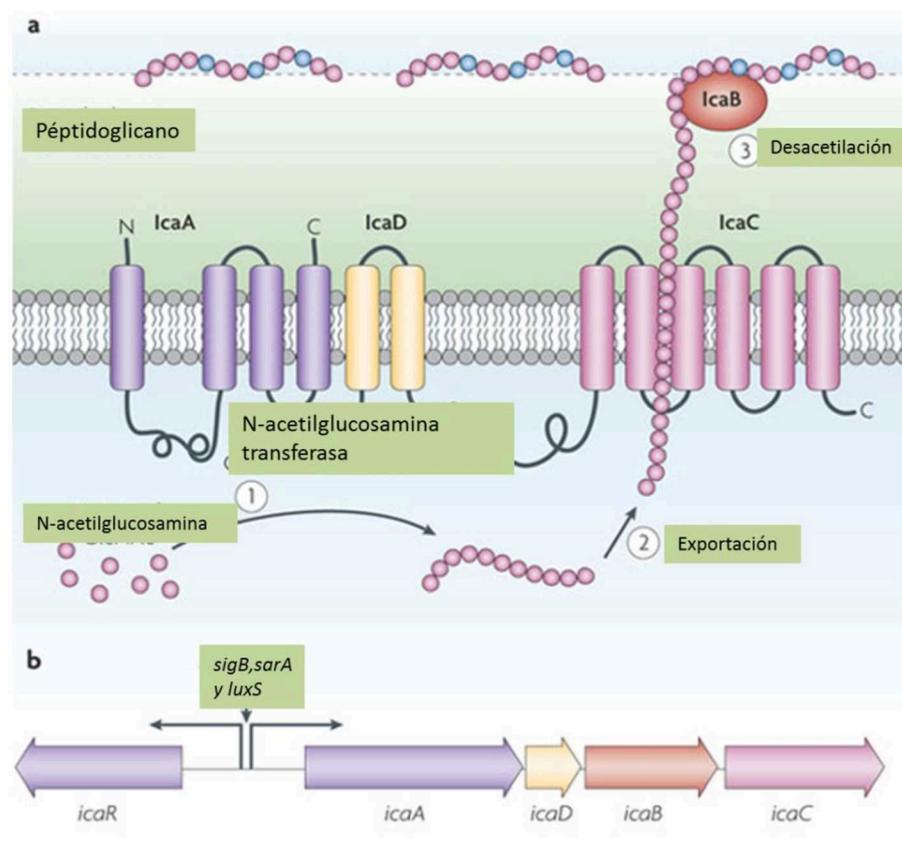


Figura 7: Regulación de la síntesis de PIA. a) Biosíntesis del PIA. b) Operón *icaADBC* (Adaptado de Otto, 2010).

Como consecuencia de la desacetilación se introducen cargas positivas en la molécula de PIA lo cual es crucial para la localización de PIA en la superficie de la célula bacteriana que está cargada negativamente, la no desacetilación resulta en pérdida de la capacidad de adherirse del PIA a la superficie de la células bacteriana (O´Gara, 2007) (Figura 7).

En general el desarrollo del biofilm en *S. aureus* causante de mastitis bovina está regulado por los locus *ica*, *bap*, *agr* (gen accesorio regulador), *SarA*, *SigB*, *IcaR*, *TcaR*, *ArlRS*, *SrrAB*, *MgrA*, y *Rbfby sar* (accesorio regulador staphylococal), los cuales responden a estímulos del huésped y del medio ambiente como; concentración de glucosa, hierro, Ca^{2+} , Mn^{2+} , pH, niveles de CO_2 , anaerobiosis, a través del mecanismo de quórum sensing para coordinar la adherencia (Oliveira y col., 2006; O’Neill y col., 2007).

En la **cuarta etapa** de la formación del biofilm (maduración final) se genera una capa mucosa denominada slime que protege la biopelícula bacteriana (Figura 6). A su vez las bacterias de la matriz se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso del desarrollo del biofilm. Finalmente, la **quinta etapa** corresponde a la liberación de las bacterias (dispersión) desde el biofilm es el proceso que menos se conoce. En el caso de *S. aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón (*icaADBC*) responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm. El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de 10^{-6} y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y poder escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto de la secuencia de inserción desde el operón *ica* provocará una nueva variación de fase. Otra alternativa consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para este proceso de biosíntesis (Ubeda y col., 2003).

El crecimiento está limitado por la disponibilidad de paso de los nutrientes para las bacterias a través del slime (Stoodley y col., 2002) así como por factores ambientales como el pH, la perfusión de oxígeno, las fuentes de carbono y la osmolaridad (Dunne, 2002). Cuando la biopelícula alcanza una masa crítica, llega a un equilibrio dinámico en el cual las capas más externas se escapan de aquel y colonizan otras superficies (Dunne,

2002). Esta conformación de biopelícula adoptada por los microorganismos les otorga ventajas, en comparación con sus contrapartes planctónicas. Esta estructura permite que aquellas cepas de *S. aureus* capaces de formar biopelículas, se adhieran y colonicen eficazmente el epitelio de la GM. No obstante, esta estructura libera células planctónicas de las capas externas permitiendo infecciones persistentes, las que generan los mayores problemas a la hora de intentar erradicar este tipo de infecciones de la GM (Melchior, 2006). Estudios realizados *in vitro* con líneas celulares epiteliales mamarias demostraron que existe una interacción específica entre las bacterias recubiertas por esta capa mucoide y las células epiteliales, la cual sería un paso fundamental en la colonización de la glándula (Pahissa, 2009).

Se ha descrito un mecanismo alternativo independiente de *icaADBC* para la formación de biofilm por parte de aislados de *S. aureus* causantes de mastitis, destacándose la participación de una proteína de la superficie bacteriana denominada *bap* (biofilm associated protein). La utilización de cepas *bap+* con el operón *ica* perturbado no alteró la formación de biofilm *in vitro* lo que sugiere que la proteína *bap* podría compensar la deficiencia del producto exopolisacárido PNAG (Cucarella y col., 2004; Lasa y Penadés, 2006). Se ha postulado que *bap* promueve la adhesión primaria de la bacteria a la superficie inerte y la adhesión intercelular, mientras que PNAG promueve la adhesión intercelular solamente. Por otra parte, Cucarella y col. (2002) han demostrado que *bap* interfiere con la actividad de las proteínas MSCRAMM disminuyendo: la adhesión a fibrinógeno y fibronectina, la adherencia al tejido glandular mamario en ensayos *ex vivo*, la internalización por las células epiteliales y la colonización inicial de la GM en ovejas. En un estudio reciente, Valle y col. (2012) demostraron que la proteína *bap* promueve la adhesión de *S. aureus* a la línea celular epitelial mamaria MAC-T; sin embargo, previene la entrada de la bacteria a las mismas. En un intento de explicar el mecanismo, se demostró que la unión directa de *bap* a la proteína chaperona Gp96 de la CEM, provoca una reducción significativa de la capacidad invasiva de *S. aureus* por interferir con la vía de invasión mediada por FnBP (Valle y col., 2012). Por otra parte, bacterias deficientes en *bap* mostraron una capacidad aumentada para invadir las CEM en un modelo de mastitis en ratón. Estos hallazgos, sumados a los de trabajos previos (Cucarella y col., 2001; Ubeda y col., 2003; Cucarella y col., 2004), demuestran que *bap* afecta la colonización inicial del tejido mamario estimulando la formación de agregados bacterianos que sobreviven adheridos a las CEM lo cual promueve la evasión del sistema inmune por el

enmascaramiento de los antígenos de superficie, lo cual facilita la persistencia de *S. aureus* a largo plazo.

La formación de biofilm de *S. aureus* también se ve influenciada por la composición genética particular del aislado de *S. aureus*. El tipo agr (gen regulador accesorio), el subtipo agr y sistema trap (target of RAP) (Gilot y col., 2002), ica, bap y genes IS257, son ejemplos de componentes del bagaje genético de una cepa particular relacionada con la formación de biofilm in vitro (Cucarella y col., 2004).

Por otra parte, la formación de biofilm contribuye a que *S. aureus* pueda resistir a la terapia antibiótica (Cucarella y col., 2004; Fey y Olson, 2010). Estudios in vitro han demostrado que el crecimiento bacteriano en biofilm puede transformar 10-1000 veces más resistentes a las bacterias a los efectos de los antimicrobianos cuando se comparan con bacterias de la misma cepa crecidas en forma planctónica (Conley y col., 2003). La resistencia antimicrobiana es a menudo transferida horizontalmente entre bacterias relacionadas y esto ocurre con notable facilidad dentro de un biofilm (Melchior y col., 2006). El locus blaZ que codifica la resistencia a penicilina (Sidhu y col., 2001), así como la formación de biofilm, está asociado con fallas de la terapia antibiótica y conduce a un mayor riesgo de presentación de IIM persistentes (Haveri y col., 2007). En los últimos años, se agregó un nuevo agravante al problema de la resistencia, con la aparición de reportes de casos de mastitis bovina producidos por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) (Moon y col., 2007; Turutoglu y col., 2009; van Duijkeren y col., 2014; Paterson y col., 2014). Sumado a que la presencia de los genes mecA y mecC en aislamientos SARM provenientes de bovinos con mastitis puede representar un riesgo de potencial zoonótico para los humanos, ya que estudios utilizando epidemiología tradicional y secuenciación genómica han identificado posible transmisión entre bovinos y humanos (Petersen y col. 2013; Harrison y col., 2013). Sin embargo, cabe destacar que si bien la detección de SARM es un evento frecuente en aislamientos de *S. aureus* de seres humanos en Argentina (Bermejo y col., 2012), hasta el momento no se ha informado la detección de SARM en aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina en nuestro país.

Estudios realizados por Melchior y col. (2009) con diferentes cepas de *S. aureus*, mostraron una alta correlación entre: el gen accesorio regulador (agr-tipo) de la cepa y la cantidad de biofilm formado por la misma; entre cepas agr-I y la presencia de genes de resistencia a β -lactamasa (blaZ) y entre cepas agr-II y la presencia del elemento de inserción IS257. Asimismo, Buzzola y col. (2007), observaron que cepas agr-I

mostraron mayor habilidad para internalizarse en células MAC-T, así como mayor persistencia en tejido mamario murino, en comparación con cepas agr-tipo II, III y IV.

En un estudio reciente, Bardiau y col. (2014) correlacionaron diferentes propiedades de una colección de cepas de *S. aureus* de leche de vacas con mastitis, con la persistencia intracelular de la bacteria en MAC-T. Estos autores encontraron asociaciones entre el tipo de PC, la supervivencia intracelular y el tipo agr; concluyendo que los aislamientos pertenecientes al grupo agr-II, que expresaron el antígeno capsular PC8 y que mostraron una baja supervivencia intracelular probablemente estén mejor adaptados al nicho extracelular. Por el contrario, los aislamientos pertenecientes al grupo agr-I, que no expresaron ningún antígeno capsular (PC8 o PC5) pero que mostraron alta sobrevivencia intracelular, probablemente estén mejor adaptados a un nicho intracelular. Estos autores también observaron que las cepas que mostraron una baja tasa de invasión no fueron capaces de producir biofilm (agr-II) o lo hicieron débilmente; mientras que las cepas que mostraron alta tasa de invasión fueron capaces de producir biofilm en forma moderada o fuerte (agr-I). Una hipótesis que podría plantearse en base a estos resultados es que las cepas del primer grupo, probablemente mejor adaptadas a un nicho extracelular, podrían llevar a infecciones agudas siendo más fácilmente eliminadas por el hospedador y las cepas del segundo grupo, probablemente mejor adaptadas a un nicho intracelular podrían conducir a infecciones persistentes, por su capacidad de sobrevivir dentro de las células del hospedador. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los resultados mencionados fueron obtenidos a partir de estudios in vitro e in vivo en modelos murinos de infección experimental, por lo cual se necesitan futuros estudios in vivo en GM bovina para confirmar estos hallazgos.

Estudios realizados sobre patologías crónicas que afectan al ser humano han demostrado que los biofilms de *S. aureus* son capaces de limitar las respuestas inflamatorias, lo que se asociaría con la persistencia de estas infecciones en un hospedador inmunocompetente (Thurlow y col., 2011). Los resultados de estos trabajos demuestran que durante el establecimiento de un biofilm se induce una respuesta inflamatoria temprana de tipo T helper 1 (Th1) y Th17 con disminución de las respuestas de tipo Th2 y Treg. Sumado a estos resultados, se ha observado que macrófagos murinos co-cultivados con biofilm de *S. aureus* han mostrado una fagocitosis limitada con respuestas inmunológicas de tipo Th2 (Thurlow y col., 2011). Si bien estos estudios abren nuevas expectativas sobre la importancia de los biofilm de *S. aureus* como mecanismo de persistencia en los tejidos de diferentes hospedadores, se

necesitan futuras investigaciones que develen la participación de los biofilm de *S. aureus* en el microambiente de la GM bovina y su contribución en la evasión de la respuesta inmune y persistencia en el tejido.

La producción de biofilm de *S. aureus* de origen mamario ha sido reportado en varios países (Dhanawade y col., 2010; Milanov y col., 2010; Oliveira y col., 2011; Chavhan y col., 2012; Szweda y col., 2012). Sin embargo, en Argentina existe escasa información sobre prevalencia de cepas de *S. aureus* con capacidad de formar biofilm aisladas de casos de mastitis bovina (Felipe y col., 2013) clínica o subclínica, ni tampoco estudios que vinculen la prevalencia de genes relacionados con la formación de biofilm y la persistencia in vivo en la GM.

1.3. Inmunidad de la glándula mamaria

El sistema de defensa de la GM contra los patógenos causantes de mastitis está mediado por factores inmunológicos innatos y adquiridos asociados a este tejido, que actúan en forma coordinada, siendo la eficiencia de estos mecanismos determinante de la resistencia a nuevas infecciones (Sordillo y col, 2002; Rainard y Riollet, 2006; Schukken y col., 2011).

Los mecanismos de la respuesta inmune en la GM bovina consisten en diversos factores físicos, celulares y moleculares que se engloban dentro de la inmunidad innata y adaptativa. La **inmunidad innata** constituye la primera línea de defensa durante las etapas tempranas de la interacción con el organismo, siendo el factor clave determinante del establecimiento, progresión y gravedad de la infección, así como del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Aitken y col., 2011). Algunos mecanismos de defensa innatos preexisten en la GM, mientras que otros se activan rápidamente después de la exposición al organismo y sus productos. Dependiendo de la eficiencia de estos mecanismos, los patógenos pueden ser eliminados en cuestión de minutos u horas después de la invasión. Si esto ocurre, no se producirán cambios notables en la función de la GM o en la calidad de la leche (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Los componentes del sistema de defensa innato de la GM incluyen **factores solubles** conformados por: la lactoerrina (Lf), lisozima, proteínas del complemento, citoquinas y quimioquinas. Además incluyen **barreras físicas** como el esfínter del pezón, **barre ras químicas** como la queratina del canal del pezón y **elementos celulares** como macrófagos, células

dendríticas (CD), mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (NK) (Rainard y Riolet, 2006).

Por otra parte, la **inmunidad específica o adaptativa** se orchestra en poblaciones celulares que reconocen antígenos particulares de los patógenos y está mediada por linfocitos B, a través de la síntesis de anticuerpos y por linfocitos T, en forma directa o a través de la síntesis de factores solubles. Esta respuesta tiene la particularidad de ser más efectiva luego de cada exposición al patógeno y su activación secundaria mediada por linfocitos T y B permitiría la eliminación del mismo (Schukken y col., 2011).

1.3.1. Reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune innata

El contacto entre las bacterias que ingresan a la GM tanto con las células del sistema inmune presentes en la leche como con las células epiteliales que recubren los conductos excretores, desencadena la inducción de la respuesta inmune innata, la cual constituye la primera línea de defensa contra los patógenos causantes de mastitis (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Una respuesta inmune rápida y efectiva se basa en el reconocimiento precoz de los patógenos potenciales (Akira y col., 2006). La respuesta inmune innata se inicia cuando receptores de reconocimiento de patrones (PRR: pattern recognition receptors) específicos, en la superficie o dentro de las células del hospedador, se unen a moléculas particulares de las bacterias, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP: pathogen-associated molecular patterns). Estos patrones moleculares constituyen un conjunto de moléculas conservadas y compartidas por grupos diversos de microorganismos y están presentes en su superficie o se liberan cuando los mismos se replican o degradan (Takeda y Akira, 2005). Los PRR son expresados por los leucocitos de la leche y por las células epiteliales que recubren la GM (Strandberg y col., 2005).

Los receptores tipo toll (TLR: toll-like receptors) forman parte de los PRR, son proteínas estructuralmente relacionadas que reconocen diferentes PAMP e inducen la producción de factores secretados como citoquinas (Akira y col., 2006). En bovinos, en los últimos años, se han descrito las secuencias de 10 TLR (Werling y col., 2006). Los receptores TLR2 y TLR4 están involucrados en forma significativa en infecciones bacterianas, activándose principalmente en respuesta a las IIM con bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente (Takeda y Akira, 2005). La unión del ligando al TLR estimula la activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) y

quinasas activadas por mitógenos (MAPK) conduciendo a la producción de importantes mediadores de la inmunidad innata, tales como interleuquina (IL) 6, IL-12, IL-18, interferón (IFN)- α e IFN- γ . Concomitantemente, la señalización por TLR induce moléculas coestimuladoras esenciales para la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), las cuales son proteínas de superficie expresadas por células presentadoras de antígeno (CPA). La presencia de estas moléculas coestimuladoras y la presentación de los componentes antigénicos microbianos activan las células T CD4+ requeridas para iniciar la respuesta inmune adaptativa (Takeda y Akira, 2005).

Todas las vías de transducción de señales de TLR activan finalmente el NF- κ B (Akira y Takeda, 2004). La vía dependiente de MyD88 (proteína de diferenciación mieloide primaria) se asocia con la fase de respuesta temprana de NF- κ B, mientras que la vía independiente de MyD88 se asocia con la fase de respuesta tardía de NF- κ B (Günther y col., 2011). La producción de mediadores cuya transcripción ocurre tras la activación de NF- κ B juega un rol crítico en la respuesta inmune de la GM frente a las infecciones. Se ha determinado que la expresión de citoquinas durante la mastitis bovina se correlaciona con la activación de NF- κ B (Yang y col., 2008; Lara-Zárate y col., 2011) y que la magnitud y duración de la respuesta de citoquinas en las IIM depende del patógeno actuante (Bannerman, 2009). En general, las bacterias Gram negativas que expresan LPS en su superficie, como los organismos coliformes, inducen una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias rápida y de mayor magnitud que las bacterias Gram positivas como *S. aureus* (Wellnitz y Bruckmaier, 2012). Estas diferencias explican en parte, por qué las bacterias coliformes causan generalmente mastitis agudas con signos clínicos, que pueden ser de moderados a severos; mientras que *S. aureus* causa mastitis que pueden comenzar con episodios agudos o subagudos, que generalmente evolucionan hacia la cronicidad con signos clínicos escasos o ausentes.

- Factores determinantes de la respuesta diferenciada de citoquinas frente a distintos patógenos

En infecciones mamarias experimentales por *Escherichia coli* se ha observado un incremento en las concentraciones de IL-1 β , INF- γ , IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-8 en leche en las primeras 48 horas post inoculación; mientras que las últimas dos citoquinas no fueron detectadas tras la infección experimental por *S. aureus*, sugiriendo que esta respuesta limitada favorecería el establecimiento de la infección por

este organismo (Bannerman y col., 2004). Sin embargo, los mecanismos determinantes de esa respuesta no han sido totalmente esclarecidos. En las IIM causadas por *S. aureus*, TNF- α , IL-1 β e IL-6 son las citoquinas pro-inflamatorias predominantes. Transcritos de ARNm para estas citoquinas han sido detectados a partir de leche proveniente de vacas con IIM crónicas (Riollet y col., 2000; Riollet y col., 2001), e IIM agudas experimentales por *S. aureus* (Lee y col., 2006), aunque la transcripción fue marcadamente menor a la observada frente a infecciones experimentales por *E. coli* (Lee y col., 2006). Un incremento en la transcripción de TNF- α fue observado en células de leche en mastitis clínica causada por *S. aureus* a las 24 horas post inoculación de la bacteria, con una fuerte disminución 8 horas más tarde (Alluwaimi y col., 2003). Esta disminución coincidió con un incremento en la producción de IL-1 β que se mantuvo elevada por 8 horas.

La expresión de citoquinas en cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas (pbMEC) cocultivadas con *E. coli* inactivadas con calor, se agrupa en una red regulatoria con una posición central de TNF- α e IL-1, mientras que en un entorno idéntico para *S. aureus*, estas citoquinas fueron reguladas negativamente. Ambas bacterias mostraron regulación positiva para IL-6 posiblemente debida a un mecanismo independiente de la vía de MyD88, ya que la anulación completa de esta vía de señalización del TLR en pbMEC no modificó la expresión de esta citoquina (Günther y col., 2011). Por otra parte, en células cocultivadas con *S. aureus* inactivados con calor se observó una regulación positiva para IFN- β , también atribuida a una activación de NF- κ B independiente de MyD88 (Günther y col., 2011). El bloqueo o falta de activación de la señalización del TLR mediante la vía dependiente de MyD88 por *S. aureus* en CEM bovinas, podría ser la causa por la cual genes efectores clave en la respuesta inmune innata, no se activan tempranamente luego de la IIM, siendo que este tipo de células predominan en la GM sana. Tales genes codifican la síntesis de enzimas bactericidas como β -defensinas (Yang y col., 2006) y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), entre otros. Particularmente, la falta de activación de estos genes en las CEM, podría explicar, en parte, la falla en la eliminación del patógeno observada en mastitis subclínicas persistentes causadas por bacterias Gram positivas (Petzl y col., 2008).

Estudios recientes han demostrado que el cocultivo de CEM bovinas con *S. aureus* aislado de mastitis clínica afecta la activación NF- κ B dando como resultado una expresión muy baja de ARNm para TNF- α (Lara-Zárate y col., 2011). Yang y col. (2008) examinaron la activación de los receptores de patógenos TLR2 y TLR4 por

ligandos derivados de *S. aureus*. Estos investigadores observaron que el cocultivo de pbMEC con *E. coli* y *S. aureus* inactivados por calor, inducían la expresión de genes para IL-8 y TNF- α ; sin embargo, la inducción por parte de *S. aureus* fue un 5% menor a la observada para *E. coli*. Esta respuesta disminuida en la expresión de citoquinas estuvo acompañada por una pérdida completa de la activación de NF- κ B por *S. aureus* o ácido lipoteicoico (LTA) en pbMEC. Los autores concluyeron que la causa de la inadecuada respuesta inmune inducida por *S. aureus* no se debió a una alteración en la unión del TLR a su ligando, sino a una regulación negativa de la activación de NF- κ B en pbMEC por el patógeno, debilitando la respuesta inmune en la GM. La falta de señalización del NF- κ B por PAMP de *S. aureus* podría relacionarse con el incremento en la producción de factor transformante del crecimiento beta (TGF- β) en la GM infectada con *S. aureus*, lo cual causaría el bloqueo de la vía de señalización dependiente de MyD88 tal como lo propone Naiki y col. (2005). Por otra parte, Gilbert y col. (2013) postulan que *S. aureus* en pbMEC, a diferencia de *E. coli*, utilizaría la vía de activación de la proteína de activación 1 (AP-1) en vez de NF- κ B induciendo una respuesta inmune más restrictiva que la de *E. coli* con la consecuente disminución en la activación de genes involucrados en el reclutamiento de células y defensas inmunes locales.

- Evasión del reconocimiento de TLR y respuesta celular

La evasión del reconocimiento de TLR ha recibido un creciente interés en los últimos años, aunque los estudios disponibles son escasos. Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de escape de las defensas inmunes del hospedador por parte de *S. aureus* que involucra la interferencia con la vía de reconocimiento de las células inmunes (Yokoyama y col., 2012). Al respecto, se ha demostrado que la proteína SSL3, un superantígeno de *S. aureus*, bloquea la activación de TLR2 a través de la interacción extracelular directa con el receptor (Bardoel y col., 2012). Particularmente, SSL3 se uniría al dominio extracelular del TLR2 inhibiendo la producción de TNF- α por parte de macrófagos murinos en respuesta a la estimulación con *S. aureus* inactivado por calor, péptidoglicanos (PGN) o lipopéptidos. Este nuevo mecanismo de evasión descrito incrementa el conocimiento actual sobre la interacción bacteria-hospedador y abre nuevos caminos para el estudio de la patogenia de la mastitis bovina causada por este patógeno. En relación al conocimiento actual sobre este tipo de exoproteínas de *S. aureus* aislados de IIM en bovinos, Smyth y col. (2007), examinaron

la ocurrencia de 7 genes que codifican para la familia de exoproteínas SSL observando que todas las cepas analizadas contenían el locus ssl con pequeñas variaciones en el número de genes ssl presentes.

Para examinar el posible rol de TLR2 en la respuesta celular, Watanabe y col. (2007) determinaron los niveles de fagocitosis y consecuente muerte de las bacterias fagocitadas por macrófagos obtenidos de ratones deficientes en TLR2 y en ratones wild-type, observando que la fagocitosis de *S. aureus* y *E. coli* fue similar entre macrófagos provenientes de ambas cepas de ratones. Sin embargo, la supervivencia de *S. aureus* fagocitados, pero no de *E. coli*, disminuyó en mayor medida en los macrófagos deficientes en TLR2 en comparación con los wild-type. Por otra parte, luego de la incubación de macrófagos de ratones wild-type con *S. aureus* observaron incrementos en los niveles de las formas fosforiladas de tres MAPK (JNK, ERK1/ERK2 y p38). En cambio, en macrófagos provenientes de ratones deficientes en TLR2, los niveles de JNK fosforilados permanecieron bajos luego de la incubación con *S. aureus* mientras que la activación de ERK1/ERK2 y p38 ocurrió normalmente. Estos resultados sugieren que de las tres MAPK solo JNK se fosforila y activa en macrófagos estimulados con *S. aureus* en una manera dependiente de TLR2. Además, ambas cepas de ratones demostraron un nivel reducido de superóxido en los macrófagos que habían fagocitado *S. aureus*. Estos investigadores proponen que tras haber reconocido a *S. aureus*, el receptor TLR2 activaría la quinasa JNK para suprimir la producción de superóxido, lo que conduciría a prolongar la vida de las bacterias en los fagosomas (Watanabe y col., 2007). Sin embargo, se necesitan futuros estudios que clarifiquen el mecanismo de regulación negativa en la producción de superóxido mediada por JNK en las bacterias fagocitadas.

Si los resultados obtenidos de los estudios mencionados se aplican a las IIM por *S. aureus* en bovinos, se podría inferir que la disminución de la habilidad de reconocer al patógeno solo o en combinación con una respuesta inmune reducida a la colonización bacteriana, podrían contribuir a la habilidad de *S. aureus* para evadir la respuesta inmune innata del hospedador y favorecer su establecimiento en la GM.

1.3.2. Células más relevantes que participan en la respuesta inmune

Las células somáticas de la leche en GM sanas están compuestas principalmente por macrófagos, pero también incluyen linfocitos, neutrófilos y CEM (Sordillo, 2005). El cambio a una población predominante de neutrófilos en la GM ocurre luego del

reconocimiento bacteriano y liberación de quimioquinas por los macrófagos y las CEM. La infección por *S. aureus* resulta en un incremento más gradual de RCS a lo largo de un período de 48 a 72 horas (Bannerman y col., 2004).

Las CEM que revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos constituyen en conjunto las primeras células que reconocen a los patógenos y participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Recientemente, en infecciones experimentales con *S. aureus* en GM bovina se demostró que las células epiteliales, en sus diferentes localizaciones, proporcionan una respuesta inmune activa y temprana contra el patógeno, destacando su importancia en la patogenia de las IIM en bovinos (Whelehan y col., 2011)

Las CEM han demostrado ser altamente inmunocompetentes (Yang y col., 2006; Lahouassa y col., 2007 Günther y col., 2009). En la GM sana, las CEM superan en número a cualquier otro tipo celular, por lo cual la probabilidad de tomar contacto con los patógenos invasores es mayor. En un estudio reciente en cabras, Brenaut y col. (2014) investigaron la respuesta transcripcional *in vivo* de las CEM luego de la IIM experimental con *S. aureus* utilizando métodos no invasivos para obtener ARN. Estos autores demostraron que las CEM son capaces de reaccionar durante las primeras 24-30 horas post infección expresando una amplia batería de genes que codifican para diferentes citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y proteínas de fase aguda, lo cual destaca su rol en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio.

La inducción de las funciones inmunes en las CEM luego del contacto con el patógeno depende de la especie bacteriana. *Escherichia coli* activa la expresión de un amplio repertorio de genes, tanto centinelas como efectores de las funciones inmunes, incrementándose dentro de las 24 horas unas 1000 veces las concentraciones de ARNm para citoquinas claves (TNF- α , IL-1, IL-8) y aproximadamente 100 veces las concentraciones de varios genes efectores de las defensas inmunes como β -defensinas, NOS2A y SAA3 (Yang y col., 2006; Günther y col., 2009). En cambio, luego del contacto con *S. aureus*, la inducción de estos genes se ve disminuida (Lara-Zárate y col., 2011). Esto se debe en parte al impedimento de la cascada de señalización dependiente de MyD88 en los receptores transmembrana TLR2 y TLR4, ya que *S. aureus* imposibilitaría la formación del llamado myddosome alrededor del dominio TIR del receptor TLR, alterando la formación de una plataforma estructural para la unión de otros factores de la cascada de señalización intracelular (Lin y col., 2010). Por lo tanto, el contacto de *S. aureus* con la membrana de la célula hospedadora provoca el deterioro

de los mecanismos auxiliares de señalización de TLR que son indispensables para el reclutamiento de MyD88 al dominio TIR del receptor (Kagan y Medzhitov, 2006). Como consecuencia, *S. aureus* induce una reacción inmune en las CEM exclusivamente dominada por la IL-6, mientras que *E. coli* también activa citoquinas adicionales (IL-1 y TNF- α). En resumen, la retroalimentación positiva que inducen IL-1 y TNF- α en la producción de citoquinas está disminuida en la respuesta inmune desencadenada por *S. aureus* en las CEM, lo cual podría favorecer la persistencia de la bacteria en la GM (Günther y col., 2011).

Gilbert y col. (2013) demostraron que la estimulación de pbMEC, tanto con LPS de *E. coli* como con sobrenadante de cultivo de *S. aureus* proveniente de mastitis bovina, no lograron aumentar los niveles de IL-1 β y TNF- α en sobrenadante de cultivo. En concordancia con estos hallazgos, Bougarn y col. (2010) también reportaron que ciertos PAMP de *Staphylococcus* como muramil dipéptido (MDP) y LTA, no lograron aumentar la producción de citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo de pbMEC. Sin embargo, estos autores encontraron que MDP y LTA actuaron sinérgicamente para inducir la producción de varios factores quimiotácticos de neutrófilos secretados por las CEM, la cual fue dependiente de la activación de NF- κ B. En conjunto, estos estudios sugieren que las CEM podrían afectar diferencialmente la respuesta inflamatoria global en función de cómo reconocen y responden a los diferentes PAMP bacterianos. Por lo tanto, la severidad y duración de la mastitis podría estar relacionada, no solamente con la expresión de TLR, sino también con las vías de señalización inducidas por TLR que se activan en las CEM.

Los **macrófagos** constituyen el tipo celular predominante en leche de la GM bovina sana durante el período de lactancia, participando en la respuesta inmune innata y adquirida. Durante las IIM los macrófagos están implicados en múltiples niveles y son indispensables para el reconocimiento y eliminación de las bacterias causantes de mastitis. Las funciones de los macrófagos en el sistema de defensa innato consisten en fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de oxígeno. Más allá de la actividad como fagocitos profesionales, la habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad de otros tipos celulares, sería la de mayor importancia en la respuesta innata de la GM (Sordillo y Streicher, 2002). De hecho, cuando los macrófagos reconocen bacterias, disparan la liberación de prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , que aumentan el proceso inflamatorio local y favorecen la actividad bactericida de los

neutrófilos. Los macrófagos también juegan un rol en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa a través del procesamiento y presentación de antígenos en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (Sordillo y Streicher, 2002).

Una alteración dramática de las capacidades funcionales de los macrófagos ocurre durante el parto y ha sido directamente relacionada con la incidencia de enfermedad. Aunque el número de macrófagos bovinos es alto en la última semana de gestación, la capacidad fagocítica de estas células decrece, posiblemente debido a la baja actividad opsonica en secreción mamaria y a una disminución de la IgM. Adicionalmente, la expresión de MHC-II por los macrófagos bovinos durante el parto disminuye, lo cual podría contribuir a una pobre presentación de antígenos y como resultado, una débil respuesta inmune específica de los linfocitos de la GM (Mallard y col., 1998). Los macrófagos también cumplen un rol en la resolución de la infección, a través de la fagocitosis de neutrófilos senescentes para minimizar el daño celular y tisular debido a los componentes tóxicos antibacterianos liberados por los neutrófilos en el sitio de infección.

Recientemente, se demostró que la infección *in vitro* de macrófagos bovinos con *S. aureus* indujo su activación tanto a través de la vía clásica como de la alternativa (Lewandowska-Sabat y col., 2013). La activación alternativa del macrófago podría ser un mecanismo que contribuye a la persistencia intracelular de *S. aureus* en el curso de la inflamación mamaria en bovinos, ya que se ha propuesto que induciría la producción de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) inhibiendo en consecuencia la vía clásica de activación del macrófago.

En un estudio realizado en tejido mamario proveniente de vacas en período de involución activa, se observó un incremento del número de monocitos/macrófagos inmunomarcados con anti CD14 en las GM de animales crónicamente infectados con *S. aureus* en comparación con glándulas no infectadas (Dallard y col., 2009); indicando que estas células podrían jugar un rol importante en las IIM causadas por este microorganismo asociado a un intento de reparar el daño tisular durante la infección crónica.

Los **neutrófilos** juegan un rol clave en las defensas de la GM y su rápida movilización desde la sangre hacia la leche es crucial para prevenir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido y la subsecuente mastitis aguda. La infiltración neutrofílica en la GM es impulsada por la detección de la bacteria o componentes de la

misma como toxinas o PAMP, por sensores del sistema inmune innato (Aitken y col., 2011).

El cambio a una población predominantemente neutrofílica en la GM ocurre luego del reconocimiento bacteriano y liberación de quimioatrayentes por parte de los macrófagos y células epiteliales. Los neutrófilos eliminan al patógeno principalmente por fagocitosis y muerte intracelular empleando numerosos mecanismos antibacterianos: formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET, del inglés Neutrophil Extracellular Trap), estallido respiratorio, péptidos antibacterianos y defensinas. Los neutrófilos activados liberan el material nuclear y el contenido de sus gránulos de manera similar a una red (NET), que físicamente atrapa bacterias. Estas trampas contienen al patógeno y lo ubican en un entorno local con altas concentraciones de agentes antimicrobianos liberados por los neutrófilos, lo cual aumenta las posibilidades de muerte de la bacteria (Brinkmann y col., 2004). Las funciones fagocíticas y el estallido oxidativo de los neutrófilos se reducen drásticamente cuando toman contacto con la leche, debido a la ingestión de grasa y caseína (Mehrzaad y col., 2005). Sin embargo, las funciones alternativas de los neutrófilos tales como la liberación de NET, no parecen verse afectadas por la presencia de leche (Lippolis y col., 2006). Por lo tanto, los NET podrían constituir importantes mecanismos bactericidas empleados por los neutrófilos durante las IIM (Lippolis y col., 2006).

El reclutamiento de neutrófilos a la GM bovina varía en intensidad y rapidez de acuerdo con el agente infeccioso (Rainard y Riollot, 2006). Trabajos realizados en mastitis bovinas experimentales subclínicas por *S. aureus*, demostraron un reclutamiento moderado ($>10^6$ células/ml) y tardío (entre 24 y 48 horas post infección) de neutrófilos a las GM inoculadas coincidiendo con el aislamiento del microorganismo de leche durante ese lapso (Riollot y col., 2000). En un estudio posterior, Riollot y col. (2001) determinaron que durante la infección crónica de la GM bovina por *S. aureus*, los neutrófilos constituyen el tipo celular predominante en leche, representado el 55 al 96% del total de células. Si bien el número de neutrófilos durante la infección crónica se incrementa notablemente, la actividad de los mismos se encuentra disminuida, manifestada por la menor expresión de moléculas de adhesión en su superficie (Riollot y col., 2001). Este tipo de respuesta podría favorecer el establecimiento de una IIM crónica durante la cual la inflamación y migración leucocitaria continúan durante meses, con el consecuente daño al parénquima mamario.

Estudios realizados *in vitro* en neutrófilos aislados de leche bovina demostraron que la producción de leucotoxinas (Luk) por parte de *S. aureus* puede contribuir a la evasión inmune en la GM (Barrio y col., 2006). Las Luk forman poros en los leucocitos inhibiendo la fagocitosis y favoreciendo la persistencia de la bacteria en la GM. Se ha demostrado que la totalidad de los aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina poseen genes para la producción de γ -hemolisina (hlg), la gran mayoría para LukE/D y del 10 al 50% de los para LukM/LukF'-PV (Fueyo y col., 2005). En neutrófilos aislados de leche bovina, LukM/LukF'-PV han demostrado ser las leucotoxinas más citotóxicas (Barrio y col., 2006).

En la Tabla 1 se resumen las funciones principales de las células que participan en la respuesta inmune innata en la GM bovina y los mecanismos potenciales que utiliza *S. aureus* para evadir la respuesta inmune celular.

Si la bacteria invasora de la GM sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada, luego de un corto periodo, por linfocitos T y B. Los **linfocitos** pueden reconocer una amplia variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana que definen la especificidad, diversidad y las características de memoria del sistema inmune. Los linfocitos T se clasifican en 2 grupos principales: $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$. En la GM bovina sana predominan los linfocitos $T\alpha\beta$ que expresan el fenotipo CD8+ fundamentalmente, en contraste con los de sangre periférica que expresan primariamente el fenotipo CD4+ (Asai y col., 1998). Dependiendo del estadio de la lactancia y de la localización en el tejido, el porcentaje de cada subconjunto de linfocitos puede variar significativamente y, en ocasiones, estos cambios se correlacionarían con una mayor susceptibilidad a enfermedades (Mallard y col., 1998).

Durante la mastitis, prevalecen los linfocitos **T CD4+** que son activados en respuesta al reconocimiento de los complejos antígeno-MHC-II en las CPA, como linfocitos B o macrófagos. Cuando un linfocito T CD4+ madura, puede diferenciarse hacia, al menos, 4 fenotipos de células Th, caracterizados según sus factores de transcripción, perfiles de citoquinas y funciones efectoras en: células Th1 (respuesta citotóxica pro-inflamatoria, productoras de IFN- γ e IL-2), Th2 (respuesta humoral mediada por células B, productoras de IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (respuesta mediada por neutrófilos, productoras de IL-17 e IL-22) y Treg (respuesta regulatoria, productoras de IL-10) (Zhu y col., 2010). Durante el parto, las células CD4+ expresan menos IFN- γ e IL-2 y aumentan la expresión de IL-4, IL-5 e IL-10, en comparación con las células CD4+ obtenidas sobre el final de la lactancia (Shafer-Weaver y col., 1999). Estas

observaciones sugieren que la activación linfocitaria hacia una vía Th2, tendría influencia sobre la respuesta inmune frente al patógeno y la susceptibilidad a IIM presentada en el periparto; aunque dicho mecanismo no ha sido aún confirmado.

Tabla 1: Funciones principales de las células que participan en la respuesta inmune innata en la GM y mecanismos potenciales utilizados por *Staphylococcus aureus* para evadir la respuesta inmune celular.

Células	Funciones inmunes principales en la GM	Potenciales mecanismos de evasión
Células epiteliales mamarias (CEM)	Rol clave en el reconocimiento del patógeno y en el inicio y desarrollo del proceso inflamatorio. Capacidad de sintetizar y secretar citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y proteínas de fase aguda.	El contacto de <i>S. aureus</i> con la CEM imposibilitaría la formación del myddosome alrededor del dominio TIR del TLR, alterando la cascada de señalización intracelular (Kagan y Medzhitov, 2006; Lin y col., 2010). <i>S. aureus</i> induce en las CEM una reacción inmune dominada por la IL-6 (Günther y col., 2011).
Macrófagos	Fagocitosis y muerte intracelular de la bacteria. Secreción de citoquinas y quimioquinas. Presentación antigénica en asociación con MHC-II.	Activación de la quinasa JNK y supresión en la producción de superóxido por parte de los macrófagos que han fagocitado <i>S. aureus</i> , prolongando la vida de las bacterias en los fagosomas (Watanabe y col., 2007). Persistencia intracelular de la bacteria por activación alternativa del macrófago. Mecanismo posible: la inducción de la producción de IL-10 inhibiría la vía clásica de activación del macrófago (Lewandowska-Sabat y col., 2013).
Neutrófilos	Fagocitosis y muerte intracelular de la bacteria. Secreción de factores antibacterianos.	En infecciones crónicas por <i>S. aureus</i> : incremento significativo en el número de neutrófilos pero disminución de su actividad y menor expresión de moléculas de adhesión en su superficie (Sears y McCarthy, 2003). Las leucotoxinas de <i>S. aureus</i> forman poros en los leucocitos inhibiendo la fagocitosis y favoreciendo la persistencia de la bacteria en la GM (Barrio y col., 2006; Fueyo y col., 2005).

Las células **T CD8+** poseen funciones tanto citotóxicas como supresoras, y por lo tanto pueden eliminar células del hospedador que expresen antígenos extraños (en asociación con el MHC-I) o pueden controlar o modular la respuesta inmune durante la infección bacteriana. Se ha sugerido que las células T CD8+ citotóxicas pueden actuar como “depuradores” (scavengers) removiendo células secretoras viejas o dañadas, las

cuales pueden incrementar la susceptibilidad de la GM a las infecciones (Taylor y col., 1994). La evaluación de secreciones lácteas de GM bovinas infectadas con *S. aureus* revela una subpoblación de linfocitos T CD8+ activados que son capaces de alterar o suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ (Park y col., 1993). Los roles inmuno-regulatorios de los linfocitos T CD8+ también dependen del estadio de la lactancia. En un estudio realizado con células de sangre periférica de vacas lecheras, se observó que linfocitos T CD8+ obtenidos en la mitad de la lactancia exhibían actividades citotóxicas y expresaban IFN- γ , mientras que los obtenidos durante el periodo post-parto temprano no presentaban actividad citotóxica y expresaban principalmente IL-4 (Shafer-Weaver y Sordillo, 1997). La predominancia del fenotipo supresor de las células CD8+ en el periparto, podría ser una de las razones que expliquen el incremento de la incidencia de IIM en dicho momento.

Las células T $\gamma\delta$ no han sido bien caracterizadas, pero se sugiere que tendrían capacidad citotóxica, lo que las convertiría en una importante línea de defensa contra agentes infecciosos, particularmente patógenos intracelulares (Skyberg y col., 2011). Soltys y Quin (1999) mostraron un aumento de estas células en sangre durante IIM estafilocócicas. Tanto en humanos como en bovinos, se ha propuesto que las interacciones que desencadenan la activación de las células T $\gamma\delta$ serían independientes de MHC y dependientes del Receptor de células T (TCR). Además, estas células podrían ser directamente activadas por PAMPs en ausencia de CPA, lo cual tendría implicancia en la respuesta inmune innata (Plattner y Hostetter, 2011). La contribución de las variaciones de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la inmunidad global de la GM no está del todo clara, debido a que las funciones biológicas de estas células son aún especulativas.

El rol primario de los **linfocitos B** es producir anticuerpos contra patógenos invasores. A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, los linfocitos B utilizan receptores de la superficie celular para reconocer patógenos específicos. En forma similar a los macrófagos y células dendríticas pueden funcionar como CPA, internalizando, procesando y presentando al antígeno en el contexto del MHC-II a linfocitos T CD4+. Después de la presentación del antígeno procesado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce a su vez la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células de memoria. A diferencia de los linfocitos T, la población de los linfocitos B en sangre permanece prácticamente constante durante todo el periodo de lactancia (Van Kampen y Mallard, 1997).

Las **células NK** son linfocitos grandes y granulares que tienen actividades citotóxicas independientes del MHC, por lo que pertenecen al sistema inmune innato. Expresan receptores que reconocen las moléculas MHC-I sin péptido unido y, a diferencia de lo que ocurre con el receptor T, dicho reconocimiento da lugar a una inhibición en lugar de una activación celular. Si la célula NK no puede reconocer la molécula de MHC-I en la superficie celular, no se envía la señal inhibitoria y la célula diana es eliminada (Lanier, 2005). En su fase efectora, la célula NK libera sus gránulos conteniendo perforinas y granzimas que destruyen la célula diana por disrupción de la membrana celular (Bryceson y col., 2006). También pueden eliminar las células blanco mediante la inducción de la apoptosis, aunque con menor eficiencia (Screpanti y col., 2005). Esta función citotóxica las hace vitales para la remoción de patógenos intracelulares y eliminación de células tumorales (Rainard y Riollot, 2006). Las células NK también son capaces de matar bacterias Gram negativas y positivas, lo que les confiere importancia en la prevención de las infecciones mamarias (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996). Sin embargo, prácticamente no existen estudios donde se aborde el rol exacto de las mismas en las IIM, y los cambios en dicha población celular, tanto frente a infecciones como en el periparto, no han sido evaluados.

1.3.3. Citoquinas y quimioquinas

El papel de las citoquinas y quimioquinas en la GM se ha estudiado intensamente en los últimos años. No sólo juegan un papel importante en la fisiología sino en los aspectos de la inflamación y la inmunidad. Sin embargo, a pesar de su rol fundamental en la respuesta del hospedador a la infección, también pueden generar efectos deletéreos sobre el mismo. Por lo tanto, existe un fino balance entre los efectos positivos y negativos de las citoquinas en el hospedador, que está establecido por la maduración, cantidad y ubicación de su expresión. La capacidad fisiológica e inmunomoduladora de las citoquinas es compleja, la mayoría tiene vidas medias muy cortas y pueden actuar en forma individual o interactuar con otras (Aitken y col., 2011).

Citoquinas pro-inflamatorias: Las dos citoquinas más importantes que claramente promueven la inflamación son IL-1 β y TNF- α . Estas interleuquinas son mediadores claves de la respuesta inmune sistémica y local. No solo regulan la expresión de una amplia batería de genes incluyendo otras citoquinas, enzimas y proteínas de fase aguda, sino también de genes relacionados con la proliferación y apoptosis. La IL-6 es la tercera citoquina pro-inflamatoria clave que media la respuesta

de fase aguda en la inflamación, aunque también puede tener propiedades anti-inflamatorias (Bannerman, 2009).

La **IL-1** está relacionada con la estimulación de la respuesta de fase aguda (Tracey, 1994). Ha sido reportado que tiene efectos específicos quimiotácticos y activadores sobre células fagocíticas, además de otros tipos de células (Di Giovine y Duff, 1990; Di Giovine y col., 1991; Dinarello, 1994). Es secretada por distintos tipos celulares (linfocitos T y B, células NK, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, queratinocitos, células de Langerhans, osteoclastos, astrocitos, células mesangiales, células del timo y córnea), aunque son los monocitos/macrófagos la principal fuente de producción (Fernández-Botran y col., 1996). Además, se ha demostrado que estimula la producción de varias citoquinas secundarias que actúan amplificando la inflamación como las IL-6 e IL-8 (Cork y Duff, 1994).

Existen dos tipos de IL-1, la IL-1 α e IL-1 β , que poseen una homología de un 25%. La IL-1 α , es producida en grandes cantidades por queratinocitos y en menor medida por macrófagos. En bovinos, la IL-1 β es producida por monocitos/macrófagos y células epiteliales. Durante la respuesta inflamatoria, IL-1 β regula la expresión de adhesinas en células endoteliales y el tránsito de neutrófilos en infecciones causadas por *E. coli*. El rol de la IL-1 β en infecciones causadas por *S. aureus* es importante solo en etapas tempranas de infección (Yamanaka y col., 2000; Zhang e Issekutz, 2002).

Comparada con otras citoquinas, la respuesta de IL-1 β frente a IIM experimentales ha mostrado ser altamente variable (Riollet y col., 2000). En el caso de IIM por bacterias Gram positivas o sin pared celular, la inducción de IL-1 β fue demorada en comparación con la infección por bacterias Gram negativas. Si bien la producción de ARNm de IL-1 β ha mostrado estar regulada positivamente en células de leche aisladas de GM infectadas con *S. aureus* (Riollet y col., 2001), se han observado resultados discordantes en cuanto a la detección de la proteína en leche. Riollet y col. (2000) no detectaron esta citoquina en leche luego del desafío experimental con *S. aureus*; en cambio, Banneman y col. (2004) observaron un aumento en las concentraciones de IL-1 β en leche luego de las 32 horas post desafío con este organismo, manteniéndose por 8 horas adicionales.

El **TNF- α** es una citoquina pro-inflamatoria producida por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales (Angelini y col., 2005), secretada tempranamente en respuesta a la estimulación microbiana. La rapidez de la liberación de esta citoquina reside en que el TNF- α se acumula como una proteína preformada de 26 kDa (pro-TNF-

α) sobre la membrana plasmática y es clivada rápidamente hasta quedar como una proteína soluble de 17 kDa por una enzima unida a la membrana, la enzima convertidora de TNF- α (TACE) (Solomon y col., 1999; Murray y col., 2005). El TNF- α es producido por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales. Participa en la actividad quimiotáctica de neutrófilos, ya que induce la expresión de moléculas de adhesión por células endoteliales. El TNF- α es la principal citoquina producida durante la etapa de infección temprana y es el responsable del shock endotóxico que se produce en una infección aguda causada por *E. coli*. La infusión intramamaria de TNF- α induce un incremento en el número de células somáticas, principalmente un aumento en la cantidad de neutrófilos (Persson y col., 1996). Al igual que la IL-1, el TNF- α es un poderoso inductor de respuesta inflamatoria, la cual puede mediar directamente o por intermedio de la IL-1 y otras citoquinas proinflamatorias. Así, el TNF- α puede inducir la producción de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1, IL-18 IFN- γ , factor transformante del crecimiento beta (TGF- β), factor inhibidor de la migración (MIF), entre otros. Igualmente, el TNF- α puede estimular la producción de hormonas como el cortisol, la epinefrina, el glucagón, la insulina y la norepinefrina (Tracey, 1994; Dinarello y Moldawer, 1999).

A nivel local, el TNF- α promueve la activación endotelial, el reclutamiento y posterior activación de leucocitos en el sitio de la infección; mientras que los efectos sistémicos incluyen la inducción de fiebre y de proteínas de fase aguda. A pesar de que estos efectos locales y sistémicos son beneficiosos para la respuesta innata del hospedador frente a la infección, el TNF- α está asociado a respuestas inflamatorias agudas que pueden amenazar la vida del animal. Como se ha mencionado anteriormente en la sección sobre reconocimiento del patógeno e iniciación de la respuesta inmune, durante la mastitis bovina causada por bacterias Gram negativas se han detectado concentraciones elevadas de esta citoquina en sangre y leche (Riollet y col., 2000; Bannerman y col., 2004) mientras que las bacterias Gram positivas o sin pared celular promueven una respuesta de TNF- α mínima o demorada (Kauf y col., 2007). A pesar de que aún se desconocen las causas de la falta de desarrollo de una respuesta TNF- α temprana en las IIM en bovinos, Kauf y col. (2007), demostraron que el organismo no parecería regular negativamente a esta citoquina, ya que la infusión de LPS en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* indujo una producción de TNF- α en concentraciones comparables con las de las infecciones por bacterias Gram negativas. Respecto de las IIM crónicas por *S. aureus*, se ha observado por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ)

un incremento significativo del área inmunomarcada para TNF- α y del número de monocitos/macrófagos CD14+ durante la involución mamaria activa, indicando que esta citoquina en asociación con los monocitos/macrófagos tiene una participación destacada en la respuesta inmune durante las IIM persistentes durante el período no lactante (Dallard y col., 2009). Son necesarios nuevos estudios para determinar la relación de esta citoquina con células del tejido mamario y otras citoquinas en IIM crónicas durante el período de involución mamaria.

La **IL-6** es una citoquina con propiedades pro y anti-inflamatorias y está implicada en aspectos que involucran tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa a través de su capacidad para inducir fiebre, diferenciación de linfocitos B y la correspondiente producción de inmunoglobulinas, la activación de linfocitos T y el incremento de la respuesta pro-inflamatoria de los neutrófilos (Keller y col., 2006). Se ha observado una mayor expresión de ARNm para IL-6 en células somáticas aisladas de leche proveniente de bovinos con mastitis adquiridas en forma natural (Riollet y col., 2001; Taylor y col., 1997) o inducidas experimentalmente (Lee y col., 2004) en comparación con células aisladas de leche de GM no infectadas. La abundancia relativa de estos transcritos ha sido detectada tanto en vacas infectadas con *E. coli* como por *S. aureus*. Asimismo, incrementos en las concentraciones de la IL-6 han sido observados en leche y sangre de vacas con mastitis adquiridas naturalmente (Hagiwara y col., 2001) e inducidas experimentalmente (Dernfalk y col., 2007).

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, estudios in vitro en pbMEC sugieren que la respuesta de estas células a *S. aureus* está dominada por la IL-6 (Günther y col., 2011) y que la rápida y elevada expresión de esta citoquina luego de la estimulación con la bacteria está acompañada de incrementos en las concentraciones de ARNm para IFN- β 1 e IFN- β 2. Se ha demostrado que el IFN- β inhibe la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-12 a través de un incremento de la síntesis de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica en seres humanos (Wang y col., 2000) y regularía en forma negativa al IFN- γ reduciendo tanto la expresión de MHC-II sobre las APC (Huynh y col., 1995) como la expresión de moléculas de adhesión y metalopeptidasas de la matriz (MMPs) (Liuzzi y col., 2004). El desafío de las pbMEC con *S. aureus* no indujo la expresión de MHC o MMPs ni de moléculas de adhesión intercelular (ICAMs), lo cual sustenta la teoría propuesta (Günther y col., 2011).

Citoquinas anti-inflamatorias: Las IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β , suprimen la producción de citoquinas inflamatorias. Estas IL se originan a partir de leucocitos que invaden la GM durante la infección.

Una de las IL anti-inflamatorias más estudiada en la respuesta inmune en la GM es la **IL-10**. Es producida por varios tipos celulares, incluyendo los linfocitos T helpers de tipo 2, células B, eosinófilos, mastocitos y células de linaje monocítico, éste último es considerado la mayor fuente de esta citoquina in vivo (Asadullah y col., 2003). La misma tiene dos funciones principales: limitar la inflamación mediante la inhibición de la síntesis de citoquinas mediante la disminución de la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Van Crevel y col., 2002) e influenciar la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa a la infección afectando la capacidad de monocitos y macrófagos para presentar antígenos a los linfocitos T por regulación negativa de la expresión de moléculas del MHC-II (Mocellin y col., 2004). Además, la IL-10, también participa en la absorción de antígenos y la diferenciación y función de linfocitos T y B (Bannerman y col., 2004).

Se ha demostrado que la infección experimental con *S. aureus* no induce una respuesta significativa de IL-10 en la GM bovina (Bannerman y col., 2006). Si bien trabajos previos han demostrado la expresión de ARNm para IL-10 en células de leche proveniente de cuartos mamarios con infecciones crónicas por *S. aureus* (Riollet y col., 2001) la estimulación de pbMEC con *S. aureus* no logró aumentar los niveles de ARNm para esta citoquina (Lahouassa y col., 2007), lo cual sugiere que las CEM no serían la fuente de IL-10 en la leche durante la infección por *S. aureus*.

La **IL-4** es una citoquina crítica que favorece el desarrollo de la respuesta celular Th2 (Seder y col., 1992). Los transcritos de esta citoquina no fueron detectados en leche de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* (Riollet y col., 2001). Por otra parte, la IL-13 no ha sido explorada en la GM bovina en infecciones por *S. aureus*.

El **TGF- β** es expresado por una variedad de leucocitos (Letterio y Roberts, 1998) y también por otros tipos celulares, incluyendo células epiteliales (Kwong y col., 2004; Zarzynska y col., 2005). Existe una interacción entre los componentes de la matriz extracelular y los factores de crecimiento en el tejido mamario. La expresión de ARNm de TGF- β 1 es más alta en la involución que en la lactación (Plath y col., 1997). El factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) activa indirectamente la forma latente de TGF- β en células epiteliales bovinas (Flaumenhaft y col., 1992), por lo que FGF-2 puede

tener un especial rol en la remodelación de la GM bovina durante la involución (Plath y col., 1998).

Se considera que en forma general es un factor que estimula la diferenciación de las células de la inflamación, pero cuando estas maduran las inhibe, favoreciendo la resolución del proceso inflamatorio (Chin y col., 2004). El TGF- β , además de sus propiedades anti-inflamatorias, regula un amplio espectro de actividades biológicas que incluyen: crecimiento y diferenciación celular, apoptosis, migración celular, angiogénesis y producción de matriz extracelular (Massague y col., 2006). Los genes de las tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) son expresados en la GM bovina (Maier y col., 1991), sin embargo, sólo TGF- β 1 y TGF- β 2 se han encontrado en leche, siendo esta última la isoforma predominante (Chockalingam y col., 2005). Bannerman y col. (2006) demostraron que la IIM por *S. aureus*, durante la mitad de la lactancia, indujo un incremento en la producción de TGF- β 1 y TGF- β 2 en leche. Por otra parte, se ha demostrado en infecciones experimentales de GM bovina durante la lactancia media y tardía utilizando diferentes cepas de *S. aureus* conocidas como SCV (small colony variant) que las concentraciones séricas de TGF- β 1 pueden variar en relación a la cepa infectante (Kim y col., 2011). Así, TGF- β es un mediador involucrado en los procesos fisiológicos y patológicos de la GM bovina que están asociados al desarrollo y la inflamación, respectivamente (Bannerman, 2009).

En diferentes estadios del desarrollo de la GM bovina, se ha reportado que el TGF- β regula el crecimiento y patrón de los ductos como también la diferenciación funcional de los alvéolos (Daniel y col., 2001). En ratón, los TGF- β son potentes inhibidores de la proliferación de las células ductales de la mama (Dickson y Lippman, 1995). La habilidad de TGF- β 1 de regular estos eventos es principalmente atribuida a sus efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las células epiteliales y sus efectos estimuladores sobre fibroblastos y otras células del estroma (Kolek y col., 2003; Musters y col., 2004).

Se ha descrito que TGF- β suprime la inflamación por regulación negativa sobre la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y por estimular la fagocitosis por parte de los macrófagos de residuos bacterianos, células inflamatorias y células dañadas (Flanders y Wakefield, 2009). El TGF- β es un importante factor de diferenciación de células Th17, las cuales estimulan la respuesta inflamatoria durante infecciones que no son suficientemente controladas por la inmunidad Th1 o Th2 (Korn y col., 2009). Las células reguladoras que incluyen Treg y macrófagos M2 también

producen TGF- β en humanos. Estas células colaboran en la prevención de los efectos adversos de la respuesta inmune prolongada o excesiva (Benoit y col., 2008). Estudios recientes, han demostrado una inmunoexpresión significativamente mayor de TGF- β 1, TGF- β 2 TGF- β 3 y de los receptores TGF- β R1 y TGF- β R3 en cuartos mamarios con infecciones crónicas por *S. aureus* en relación a cuartos mamarios no infectados, lo que sugiere una respuesta dirigida a limitar el alcance de la inflamación y lesión tisular generada por el proceso infeccioso crónico (Andreotti y col., 2014).

Los IFN constituyen una familia de citoquinas con funciones inmunes moduladoras. Los IFN de tipo I, como IFN- α e IFN- β , son expresados por todos los tipos de células, mientras que el IFN- γ es producido exclusivamente por los leucocitos y es el más estudiado en la inmunidad de la GM bovina. Recientemente Gilbert y col. (2013) demostraron una respuesta diferencial mayor en la activación de la vía del IFN tipo I luego de la estimulación de pbMEC con LPS de *E. coli*, no observándose tal respuesta luego de la estimulación con sobrenadante de cultivo de *S. aureus*. En contraposición a estos resultados otros estudios han demostrado la capacidad de *S. aureus* de activar genes dependientes de IFN (Günther y col., 2011). Günther y col. (2011) postulan que la activación de genes dependientes de IFN también puede resultar de la estimulación autocrina/paracrina de las CEM por la IL-6, gatillando la vía de STAT3. La sobreexpresión de genes dependientes de IFN fue detectada luego de las 24 horas de exposición de pbMEC a *S. aureus* inactivado por calor, por lo cual la estimulación de genes dependientes de IFN podría ser un evento tardío en la interacción *S. aureus*/CEM al contrario de lo que ocurre en la interacción *E. coli*/CEM (Gilbert y col., 2013).

El IFN- γ promueve la diferenciación de células Th1 y suprime de forma concomitante la actividad de células Th2. Durante el curso de IIM experimentales por *S. aureus* se detectaron incrementos en las concentraciones de IFN- γ en leche y en la expresión cuantitativa de ARNm en células epiteliales, aunque en forma más tardía comparado con la infección por *E. coli* (Riollet y col., 2001; Bannerman y col., 2004; Lee y col., 2006; Kauf y col., 2007). Es interesante destacar que las mayores concentraciones de IFN- γ han sido detectadas en IIM caracterizadas por una persistencia de la infección y que estas elevadas concentraciones coincidieron con un mayor número de bacterias recuperadas de las GM infectadas en comparación con GM no infectadas (Kauf y col., 2007). Esta característica puede reflejar un intento del huésped de intensificar las respuestas inmunes mediadas por células para erradicar los

patógenos que no son efectivamente eliminados por los mecanismos de defensa innatos en etapas más tempranas de la infección.

Estudios recientes han destacado la importancia de IFN tipo III (IFN- λ) en la regulación de citoquinas inflamatorias durante infecciones pulmonares causadas por *S. aureus* en humanos, sin embargo se desconoce la importancia de este tipo de IFN en IIM en bovinos (Cohen y Prince, 2013).

Las **quimioquinas** constituyen una gran familia de citoquinas que estimulan la migración de leucocitos desde la sangre al sitio de la inflamación. Mientras el reclutamiento de granulocitos, monocitos, macrófagos y células NK median la eliminación del patógeno, la migración de células T y B inducen la respuesta inmune humoral en la GM. La IL-8 o quimioquina CXCL8 ha sido más estudiada en la GM bovina durante la respuesta inmune. Numerosos trabajos demuestran un significativo aumento en la expresión cuantitativa de ARNm para CXCL8 en el tejido mamario y de la proteína CXCL8 en leche después de la infección con diferentes patógenos causantes de mastitis (Bannerman, 2009). Esta quimioquina interactúa con los receptores de quimioquinas 1 (CXCR1) y CXCR2 para mediar la migración de granulocitos y la acumulación de macrófagos en el sitio de infección. Los neutrófilos constituyen una primera línea de defensa inmune celular y son reclutados tempranamente por CXCL8 en respuesta a la infección (Riollet y col., 2000).

El rol de la IL-8 en las IIM por *S. aureus* en asociación con otros componentes de la inmunidad innata se ha señalado en diferentes secciones de la presente revisión por lo cual a modo de resumen se puede mencionar que, estudios realizados con diferentes cepas de *S. aureus* no han logrado detectar incrementos de IL-8 en leche luego de la infección intramamaria experimental (Riollet y col., 2000). Por otra parte, numerosos trabajos independientes con diferentes cepas de *S. aureus* han mostrado expresión disminuida o ausencia completa de ARNm para IL-8 en tejido mamario y en células de la leche en respuesta a la infección experimental (Lee y col., 2006; Yang y col., 2007).

En la Tabla 2 se resumen los mecanismos inducidos por *S. aureus* que determinan una respuesta diferenciada de citoquinas en la GM bovina.

Tabla 2: Mecanismos inducidos por *Staphylococcus aureus* que conducen a una respuesta diferenciada de citoquinas en la glándula mamaria bovina según estudios realizados in vivo e in vitro.

Citoquinas	Respuesta a <i>S. aureus</i> /LTA	Mecanismo potencial	Modelo experimental
TNF-α	Ausencia en leche durante las primeras 48 hs post infección (Bannerman y col., 2004). Expresión génica aumentada en leche a las 24 hs post infección con fuerte disminución 8 horas más tarde (Alluwaimi y col., 2003; Lee y col., 2006).	Bloqueo o fracaso en la activación de señalización de TLR mediante la vía dependiente de MyD88 con la consecuente disminución en la síntesis de enzimas bactericidas y compuestos antibacterianos.	Infecciones intramamarias experimentales con <i>S. aureus</i> .
	Niveles no detectables en sobrenadante de cultivo de pbMEC (Bougarn y col., 2010; Gilbert y col., 2013). Expresión génica disminuida en pbMEC (Lahouassa y col., 2007; Yang y col., 2008; Günther y col., 2011; Lara-Zárate y col., 2011).	Regulación negativa de la activación de NF- κ B por el patógeno.	Estudios in vitro
IL-1β	Resultados discordantes en cuanto a su detección en leche: Incrementos de los niveles a las 32 hs post infección, manteniéndose elevada por 8 hs (Bannerman y col., 2004) o ausencia (Riollet y col., 2000; 2001). Expresión génica aumentada en leche a las 32 hs post infección, manteniéndose elevada por 8 hs (Alluwaimi y col., 2003; Lee y col., 2006).	Bloqueo o fracaso en la activación de señalización de TLR mediante la vía dependiente de MyD88 con la consecuente disminución en la síntesis de enzimas bactericidas y compuestos antibacterianos.	Infecciones intramamarias experimentales con <i>S. aureus</i>
	Niveles no detectables en sobrenadante de cultivo de pbMEC (Bougarn y col., 2010; Gilbert y col., 2013). Expresión génica disminuida en pbMEC (Lahouassa y col., 2007; Günther y col., 2011; Lara-Zárate y col., 2011)	Regulación negativa de la activación de NF- κ B por el patógeno.	Estudios in vitro
IL-8	Ausencia en leche durante las primeras 48 hs post infección (Bannerman y col., 2004).	Bloqueo o fracaso en la activación de señalización de TLR mediante la vía dependiente de MyD88 con la consecuente disminución en la síntesis de enzimas bactericidas y compuestos antibacterianos.	Infecciones intramamarias experimentales con <i>S. aureus</i> .
	Expresión génica disminuida en pbMEC (Lahouassa y col., 2007; Yang y col., 2008; Lara-Zárate y col., 2011).	Regulación negativa de la activación de NF- κ B por el patógeno.	Estudios in vitro

Tabla 2 (continuación)

IL-6, IFN-β	Expresión génica aumentada en pbMEC (Günther y col., 2011).	Activación de NF- κ B por un mecanismo independiente de la vía de MyD88.	Estudios in vitro
TGF-β	Expresión génica aumentada en pbMEC (Gilbert y col., 2013).	Bloqueo de la vía de señalización dependiente de MyD88. Posible utilización de la vía AP-1.	Estudios in vitro
	Expresión proteica aumentada en IIM crónicas por <i>S. aureus</i> (Andreotti y col., 2014).	Intensa remodelación del tejido mamario infectado.	Estudios ex vivo

1.4. Modelo murino de infección experimental con *S. aureus*.

El modelo de mastitis causada por *S. aureus* en ratón fue descrito por primera vez en 1970 por Chandler. A partir de entonces, este modelo se ha utilizado para evaluar la patogenicidad de las IIM causadas por *S. aureus* (Anderson y Chandler, 1975; Anderson y col., 1976; Reid y col., 1976; Anderson, 1981; Chandler y col., 1980; Brouillette y col., 2003) y el papel de potenciales factores de virulencia bacteriana (Calvinho y col., 1993; Jonsson y col., 1985; Brouillette y col., 2003; 2005; Tuscherr y col., 2005, Tuscherr y col., 2008). Además, la protección conferida por la inmunización (Mamo y col., 1994; 2000; Gómez y col., 2002; Gong y col., 2010) y el efecto de la administración de antibióticos contra IIM por *S. aureus* (Anderson y Craven, 1984; Bramley y Foster, 1990; Sánchez y col., 1994).

El uso del modelo en ratón es una alternativa relativamente económica que requiere del cuidado estándar y de experiencia básica en el manejo de animales de laboratorio. En la actualidad, este modelo continúa siendo una herramienta adecuada para los trabajos de investigación que se centran en la patogénesis y control de las IIM en bovinos (Brouillette y Malouin, 2005; Notebaert y Meyer, 2006). En forma similar al bovino, el ratón posee dos pares de GM en la región inguinal, además posee tres pares en la región torácica que no están presentes en la ubre bovina. Ambas especies poseen glándulas que son anatómicamente y funcionalmente independientes entre sí y cada GM posee un conducto primario del pezón que desemboca en un orificio único. Como en el bovino, el modelo de mastitis en ratón también proporciona un ambiente único de

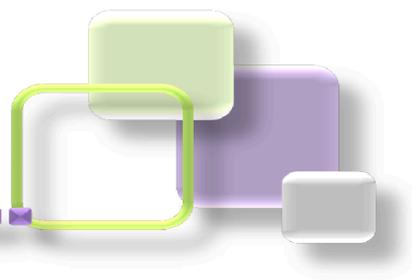
crecimiento del patógeno en la leche y permite la interacción del organismo con las células del hospedador y los componentes inmunes, además de ofrecer factores físicos como el amamantamiento. En modelos *in vitro* estas características no son tomadas en cuenta (Notebaert y Meyer, 2006). También beneficioso para el estudio de la mastitis es el hecho de que observaciones en el ratón concernientes a recuentos bacterianos, número de neutrófilos y cambios histológicos son similares a las observadas en bovinos (Chandler, 1970). Broulliette y col. (2005) desarrollaron un método para cuantificar la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) en tejido mamario de ratón como marcadores de inflamación y carga bacteriana en secciones de tejidos infectados.

Aunque existen similitudes, también existen diferencias entre ambas especies. Por ejemplo, la ubre bovina contiene un mayor número de células fagocíticas residentes en comparación con las que se encuentran en la GM de ratón (Anderson y Heneghan, 1979) y la composición de la leche difiere en forma significativa en relación a la cantidad de proteínas, grasas y carbohidratos. A diferencia del bovino, la cuantificación del número de células somáticas en ratón no se realiza debido a la dificultad para obtener muestras de leche. Debido a estas diferencias, los resultados obtenidos a partir de experimentos realizados en ratón no deben ser totalmente extrapolados al bovino. Muchos investigadores resaltan la importancia de realizar una valoración final en bovinos luego de los estudios en el modelo de mastitis en ratón (Notebaert y Meyer, 2006). Sin embargo, el modelo de infección murino ofrece perspectivas adicionales muy atractivas para el estudio de la enfermedad. La disponibilidad de mayor número de animales permite el screening de numerosos compuestos con potencial como inmunomoduladores o antimicrobianos. En bovinos, estos experimentos son muy caros y consumen tiempo. Además, para obtener estadísticas válidas el número mínimo de animales se obtiene fácilmente usando ratones. Nuevas tecnologías como imágenes real-time *in vivo* son sólo aplicables a animales de laboratorio. Más importante aún, la generación de mutantes o ratones transgénicos o knock-out en la actualidad han hecho posible el estudio profundo de los mecanismos moleculares de la patogenia de la mastitis (Kerr y col., 2001; Elazar y col., 2009).

Como se desprende de lo citado precedentemente, desde los comienzos del siglo pasado hasta nuestros días, los modelos murinos han contribuido a la comprensión de la patogénesis de la mastitis y al desarrollo de nuevas terapias. Estos modelos animales representan un recurso esencial para la generación de nuevos conocimientos sobre

mecanismos de enfermedad y constituyen parte imprescindible del puente traslacional entre la investigación básica y su proyección clínica.

2. OBJETIVOS



2.1. Objetivo general e hipótesis de trabajo

En base a los antecedentes anteriormente descriptos, la hipótesis planteada en la presente tesis es que, la interacción de *S. aureus* con las CEM bovinas y la respuesta inmune del hospedador frente a la infección experimental por la bacteria varían con la cepa infectante, y tales variaciones se asocian con las características clínicas de la IIM producida y con las características fenotípicas y genotípicas de las cepas. Es por ello que se propuso como objetivo general, investigar aspectos de la interacción patógeno-hospedador y caracterizar la respuesta inmune inducida, durante la infección mamaria experimental en un modelo murino, con cepas de *Staphylococcus aureus* seleccionadas según criterios clínicos, epidemiológicos, fenotípicos y genotípicos que permitan establecer diferencias y asociaciones entre las mismas.

2.2. Objetivos específicos

- a) Seleccionar diferentes cepas de *S. aureus* sobre la base de su comportamiento clínico, prevalencia y recuento de células somáticas promedio del rodeo de origen, respuesta a la terapia antibiótica, susceptibilidad a antimicrobianos, producción de β -lactamasa, producción de toxinas y genotipo, que permitan caracterizarlas respecto de su potencial capacidad infecciosa, como de baja adaptación a la glándula mamaria y alta adaptación a la glándula mamaria y tendencia a la cronicidad.
- b) Evaluar in vitro en una línea de células epiteliales mamarias bovinas la capacidad de invasión de las cepas seleccionadas y establecer diferencias entre las mismas.
- c) Evaluar la prevalencia y expresión relativa de genes involucrados en la adherencia, internalización y formación de biofilm en las cepas seleccionadas y establecer diferencias.
- d) Desarrollar un modelo de mastitis en ratón con dos cepas de *S. aureus* seleccionadas por poseer características distintivas según los criterios establecidos anteriormente.
- e) Evaluar in vivo en un modelo murino el nivel de infección, los cambios histológicos y la reacción inflamatoria inducida por las cepas seleccionadas tras la inoculación experimental y establecer diferencias entre las mismas.

- f) Caracterizar aspectos de la respuesta inmune inducida en el hospedador tras la inoculación experimental de las bacterias seleccionadas y establecer diferencias entre cepas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Selección de las cepas de *Staphylococcus aureus*

De una colección de 300 cepas de *S. aureus* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología y Calidad de Leche de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) se seleccionaron 40 cepas provenientes de vacas con IIM clínicas y 21 cepas provenientes de vacas con IIM subclínicas. Los aislados de *S. aureus* provenían de diferentes tambos de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires.

Las cepas preseleccionadas fueron caracterizadas sobre la base de datos epidemiológicos del rodeo de origen (alta o baja prevalencia de IIM por *S. aureus*, considerando alta >15% y baja <10%, en base al muestreo y posterior cultivo de leche de todos los animales en lactancia), RCS promedio del tambo de origen (bajo RCS: <200.000 cél/ml y alto RCS: >500.000 cél/ml), manifestaciones clínicas (mastitis clínica o subclínica), respuesta al tratamiento antimicrobiano ante un protocolo estandarizado (favorable: curación bacteriológica o desfavorable: ausencia de curación bacteriológica a los 14 días post tratamiento) y producción de α y β -toxinas. Se consideró como mastitis clínica la presencia de alteración macroscópica de la leche al momento de la toma de la muestra, con o sin signos cardinales de inflamación. Todas las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente por pruebas estándares (Oliver y col., 2004). Los procedimientos de selección enunciados fueron realizados en la EEA Rafaela de INTA en el marco de diferentes proyectos de investigación por lo cual no se presentan en esta tesis.

A partir de los criterios anteriores del total de cepas se seleccionaron 15 aislados provenientes de IIM clínicas y 21 aislados provenientes de IIM subclínicas.

Las cepas de *S. aureus* fueron conservadas a -80°C en caldo tripteína soya (CTS) (Britania) mediante el agregado de glicerol 15% (v/v) como agente crioprotector. Al momento de ser utilizadas, las mismas fueron reactivadas mediante la siembra en placas de Petri conteniendo agar tripteína soya (ATS) (Britania) y posterior incubación a 37°C durante 16 horas.

En una primera etapa se realizó la caracterización fenotípica de los aislados utilizando pruebas estándares (Oliver y col., 2004) y la caracterización genética de especie mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico. Posteriormente, los mismos fueron procesados para la realización de la

técnica de electroforesis de campos pulsantes (PFGE) que permitió la caracterización genética a través de la obtención de los patrones clonales.

3.2. Caracterización fenotípica de las cepas de *S. aureus*

a) Prueba del Agar Manitol Salado (AMS).

Fundamento: Este medio es selectivo y diferencial. Primeramente, permite el aislamiento de estafilococos, debido al alto contenido salino que refleja el carácter selectivo de dicho medio ya que inhibe el crecimiento de géneros distintos a *Staphylococcus* spp. Por otra parte, permite caracterizar la especie *S. aureus* ya que la misma es capaz de fermentar el manitol con producción de ácido que conlleva a la disminución del pH del medio y en consecuencia, al viraje de color del indicador rojo fenol dando colonias rodeadas de un halo amarillo. Los estafilococos coagulasa negativos presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura.

Procedimiento: Se prepararon placas con medio AMS (**Anexo I**). Posteriormente se sembraron en ellas, por el método de cinco estrías, las cepas previamente crecidas a 37°C por 16 horas en placas con ATS (**Anexo I**). Se cultivaron en estufa a 37°C durante 18 a 24 horas.

Interpretación de los resultados:

- ❖ Estafilococos coagulasa positivos (+): Buen crecimiento con un halo amarillo a su alrededor.
- ❖ Estafilococos coagulasa negativos (-): Crecimiento de colonias sin viraje de color del medio.

b) Observación del patrón de hemólisis

Fundamento: Muchos microorganismos son capaces de crecer en agar sangre y cuando lo hacen responden de diferente manera según realicen o no la lisis de los glóbulos rojos (hemólisis) producida por la acción de una enzima llamada hemolisina.

Procedimiento: Se realizó una siembra del cultivo puro mediante la técnica del agotamiento en ansa en una placa de agar sangre (**Anexo I**). Tras 24 horas de incubación se observó la presencia de halos de hemólisis alrededor de las colonias y se identificó el tipo de hemólisis producida por el microorganismo de interés.

Interpretación de los resultados:

- ❖ Hemólisis α : zona estrecha de hemólisis completa
- ❖ Hemólisis β : zona amplia de hemólisis incompleta

c) Prueba de la coagulasa (en tubo)

Fundamento: Esta prueba se basa en la capacidad de un microorganismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. La pared celular posee una proteína llamada coagulasa de unión, presente en *S. aureus*, la cual reacciona con el fibrinógeno produciéndose un coágulo de fibrina.

Procedimiento: Se colocaron 200 μ l de plasma de conejo estéril en un tubo de hemólisis estéril. Se introdujeron de 2 a 3 colonias puras de un cultivo en placa y se resuspendió por agitación. Se incubó a 37°C y se observó coagulación a las 4, 8 y 24 horas.

Interpretación de los resultados:

- ❖ Prueba (+): se forma un coágulo o filamentos de fibrina definidos que ocupa parcial o totalmente el volumen de plasma.
 - +1: pequeños coágulos.
 - +2: pequeños coágulos organizados.
 - +3: coágulos bien organizados.
 - +4: Todo el cultivo coagulado. Al invertirlo no se vuelca ni se desplaza.
- ❖ Prueba (-): no hay formación de coágulo, la suspensión se mantiene homogénea.

d) Prueba de la catalasa (Método del porta objetos)

Fundamento: Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa. Esta prueba permite distinguir el género *Staphylococcus*, catalasa (+) de otros géneros catalasa (-)

Procedimiento: Se recogió el centro de una colonia pura de un cultivo en placa con una aguja de inoculación y se colocó en un portaobjetos de vidrio limpio. A continuación se agregó sobre las bacterias una gota de H₂O₂ al 10%.

Interpretación de los resultados:

- d) Prueba (+): formación inmediata de burbujas bien visibles por la liberación de O₂.
- e) Prueba (-): no hay formación de burbujas (no se forma O₂).

e) Producción de acetoina a partir de la glucosa (Prueba de Voges-Proskauer)

Fundamento: La reacción de Voges-Proskauer detecta aquellos microorganismos que forman el producto 2,3 butanodiol que existe en equilibrio con la acetoina. Esta es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno, la acetoina es oxidada debido a la presencia de alfa-naftol dando un color rojo fucsia (**Anexo I**).

Procedimiento: Se utilizó un cultivo puro de 24 h de incubación a 37°. Luego de la incubación se agregaron 0,6 ml de alfa-naftol al 5% y 0,2ml de KOH al 40%. Se dejó reposar durante 10-15 minutos.

Interpretación de los resultados:

- ❖ (+): La aparición de un color rojo intenso.
- ❖ (-): No aparece el color rojo.

f) Ensayo en placa para producción de biofilm

Procedimiento: La cuantificación de la formación de biofilm en superficie abiótica fue evaluada según el método descrito por Stepanovic y col. (2007) con modificaciones. Para la preparación del inóculo, todas las cepas de *S. aureus* se multiplicaron en cultivo puro en agar base durante 24 horas, a 37°C. Se inoculó una colonia en 5 ml de caldo tripteína soya (CTS) (Britania) y se incubó por 24 horas a 37°C; luego se realizó una dilución 1:100 en medio fresco CTS con 1% glucosa. Se tomaron alícuotas de 200 µl de la suspensión de cada aislado de *S. aureus* y se inocularon individualmente por triplicado en pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (GBO). Se incluyeron seis pocillos con CTS en cada placa como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas (**Anexo I**).

Posteriormente, el contenido se removió invirtiendo la placa y los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de buffer fosfato salino (PBS), pH 7,2 luego las placas se secaron en posición invertida. Para fijar las bacterias se agregó 150 µl de metanol durante 20 minutos, luego se retiró el metanol y se dejó en posición invertida toda la noche a temperatura ambiente. La tinción se realizó con 150 µl de una solución al 2% de cristal violeta utilizado para la tinción de Gram (2% cristal violeta, Hucker). A los 15 minutos se enjuagó la placa con agua corriente hasta eliminar todo exceso de tinción. La decoloración se realizó añadiendo 150 µl de una solución de etanol 95% durante 30 minutos. La densidad óptica (DO) se midió a 570 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar^{Nano} BMG LABTECH), el valor de DO se consideró proporcional a la

formación de biomasa o cantidad de biofilm. El experimento se repitió tres veces. Se incluyó como control positivo la cepa *S. aureus* V329 formadora de biofilm cedida por el Dr. José Rafael Penades de la Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia, España.

Interpretación de los resultados: de acuerdo con la metodología empleada Stepanovic y col. (2007) el valor de corte por DO (DOc) se definió como el valor de la media del blanco más tres desviaciones estándar por encima de la misma, por tanto las cepas se clasificaron de la siguiente forma:

- (-) no productoras de biofilm ($DO \leq DOc$);
- (+) débiles productoras de biofilm ($DOc < DO \leq 2x DOc$);
- (++) moderadas productoras de biofilm ($2x DOc < DO \leq 4x DOc$);
- (+++) fuertes productoras de biofilm ($4x DOc < DO$).

En la Figura 8 se muestra una representación de los resultados sobre la formación de biofilm en una placa de poliestireno.

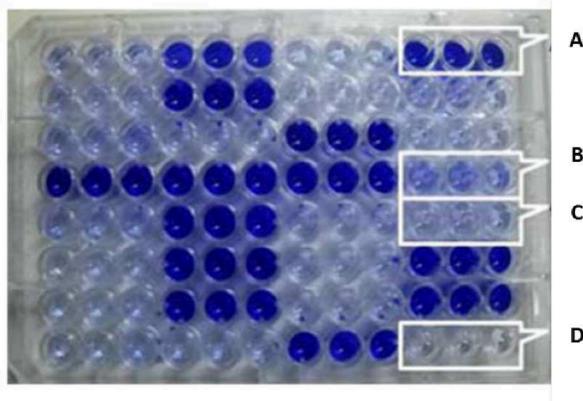


Figura 8: Representación de la detección de biofilm en placa de poliestireno. **A:** cepa fuerte productora; **B:** moderada; **C:** débil; **D:** no productora de biofilm (Peña y Uffo 2013).

3.3. Caracterización molecular de las cepas de *S. aureus*

3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

a) Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de los aislados de *S. aureus* fue obtenido aplicando el método descrito por Kumar y col. (2008) con algunas modificaciones. Las células recuperadas por centrifugación a partir del cultivo en medio líquido (CTS), fueron resuspendidas en 250 μ l de Tris-HCl 10 mM pH 8 (**Anexo I**) y 25 μ l de lisozima (Genbiotech S.R.L.) 25 mg/ml e incubadas a 37°C durante 2 horas en baño de agua termostático. La lisis se

produjo mediante la incubación a 50°C durante 1 hora con el agregado de 38,7 µl de proteinasa K (Genbiotech S.R.L.) 20 mg/ml y 500 µl de buffer de lisis (**Anexo I**). Posteriormente se agregaron 500 µl de la mezcla fenol:cloroformo (1:1) y se centrifugó. Se extrajo la fase superior acuosa, a la cual se le adicionaron 250 µl de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para lograr separar el ADN de la fracción proteica. Finalmente el mismo se precipitó con el agregado de 25 µl de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol 95%. Luego de 24 horas a -20°C se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC.

La cuantificación del ADN extraído se realizó espectrofotométricamente mediante lectura de absorbancia a 260 nm. Asimismo se realizó la lectura a 280 nm para calcular la relación 260/280 y determinar el nivel de pureza del mismo en la muestra. Siendo aceptable para el caso de ADN, un valor de relación de 1,8 o superior.

b) Amplificación de una secuencia nucleotídica específica de *S. aureus*

La identificación molecular de *S. aureus* se llevó a cabo mediante PCR utilizando el protocolo previamente descrito por Martineau y col. (1998).

El par de oligonucleótidos utilizados amplifica un fragmento especie-específico con una longitud de 108 pares de bases (pb). Las características de los mismos se muestran en la Tabla 3. El alineamiento de estos oligonucleótidos utilizando el programa Primer Blast, indicó que los mismos amplifican una región que codifica para una proteína de la familia de las glutamato sintetasas.

Tabla 3: Nombre, secuencia y características del par de oligonucleótidos utilizados en la identificación molecular de *S. aureus*. Extraídos de Martineau y col. (1998). Ta: Temperatura de unión específica o annealing.

Oligonucleótido	Secuencia (5'- 3')	Longitud (nucleótidos)	Ta (°C)
Sa442-1	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	30	63.71
Sa442-2	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA	30	58.22

Para la reacción se utilizó un termociclador Ivema T-18 (Ivema Desarrollos S.R.L.). Se colocaron aproximadamente 120 ng de ADN genómico como molde en un volumen total de 20 µl. Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción y sus

correspondientes concentraciones finales se detallan junto al programa de ciclado en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4: Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación y sus correspondientes concentraciones finales en un volumen final de 20 μ l.

Tabla 5: Etapas del programa de amplificación utilizado. En cada caso se detalla la cantidad de ciclos como también la duración y la temperatura aplicada.

Reactivo	Concentración final	Etapa de ciclado	Condiciones
Buffer 5X	1X	Desnaturalización inicial	96°C - 3 min
dNTP	0,25 mM	Desnaturalización	95°C - 30 seg
MgCl ₂	2,4 mM	Amplificación (30 ciclos)	Hibridación 55°C - 30 seg
Taq Pol	0,075 U/ μ l		Extensión 72°C - 1 min
Sa442-1	1 μ M	Extensión final	72°C - 2 min
Sa442-2	1 μ M		

Como control positivo se utilizó una cepa de *S. aureus* previamente caracterizada bioquímica y molecularmente. Para el control negativo se utilizó agua DEPC 0,1%.

c) Electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó un gel al 3% debido a la longitud del fragmento a identificar (108 pb). El mismo fue preparado con buffer TAE 1X pH 8 (**Anexo I**) y el agregado de bromuro de etidio (EtBr) 1% P/V. Del volumen total de cada reacción de PCR, se corrieron 10 μ l durante 20 minutos a 90 V en buffer TAE 1X. Por último, las bandas fueron visualizadas al colocar el gel sobre un transiluminador UV (Fotodyne Incorporated).

3.3.2. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes

Con la finalidad de evaluar la diversidad genética de las 15 cepas preseleccionadas provenientes de IIM clínicas y de las 21 cepas provenientes de IIM subclínicas se realizó la técnica de PFGE. La misma permitió la caracterización genética en pulsotipos.

La realización de esta técnica consistió en tres fases: a) Extracción del ADN cromosómico bacteriano, b) Restricción del ADN utilizando enzimas de restricción de

baja frecuencia de corte y, c) Separación de los fragmentos obtenidos mediante un sistema de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

a) Extracción de ADN

Se incubaron 3 ó 4 colonias aisladas en 2 ml de ATS a 37°C durante 16 horas. Posteriormente, 1 ml del cultivo crecido se centrifugó a 12.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. El pellet bacteriano se resuspendió en 200 µl de Buffer PIV. Esta suspensión se denominó solución de trabajo (ST). Se midió la densidad óptica de esta suspensión a 620 nm. Este valor se utilizó para calcular el volumen de solución PIV (Δ) que se debió agregar a la ST para que todas las muestras alcancen una $DO_{620}=5$.

$$(\Delta) \quad \boxed{Vol_{dil} = (DO_{620} \times 40 \times 210) - 210}$$

Se mezclaron partes iguales de la ST con $DO_{620}=5$ y de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%. Con micropipeta, se realizaron gotas con 20 µl de la mezcla sobre una superficie de vidrio. Se dejaron solidificar durante 5 minutos a -20°C y 10 minutos a temperatura ambiente. Luego estas gotas de agarosa solidificadas se incubaron en buffer EC-Lisis (**Anexo I**) a 37°C durante 5 horas y posteriormente 18 horas a 50°C en buffer ES-P (**Anexo I**) en baño de agua. Posteriormente, los bloques de agarosa se lavaron 6 veces durante 30 minutos con buffer Tris EDTA (**Anexo I**).

b) Restricción del ADN

Los bloques de agarosa se incubaron en 500 µl de buffer Pre-SmaI con β -mercaptoetanol (**Anexo I**) durante 1 hora a 25°C. Se aspiró el buffer y se agregaron 45 µl de buffer Pre-SmaI y 15 U de SmaI. Se incubaron a 25°C en baño de agua durante 17 horas.

c) Electroforesis de los fragmentos de restricción e interpretación de resultados

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X. En cada uno de los pocillos se colocaron los bloques de agarosa digeridos y el marcador de peso molecular. Los fragmentos de ADN fueron separados con un equipo CHEF DRIII System (BIO-RAD). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: distribución lineal de pulsos de 5 a 35 segundos, a 6 V/cm durante 23 horas. El alto voltaje usado fue necesario para lograr una adecuada separación de los fragmentos grandes de ADN, por ello el buffer de

corrida debe recircular a través de un módulo de enfriamiento, lográndose así mantener su temperatura constante, ajustada a 11,3°C. Los geles fueron coloreados con 0,5 mg/l de EtBr y el ADN visualizado con un transiluminador de UV.

d) Análisis de los patrones de bandas obtenidos

Con el objetivo de conocer la relación clonal entre las cepas analizadas y poder discernir entre pulsotipos se siguió el criterio establecido por Tenover y col. (1995). Para ello, los perfiles de bandas generados por PFGE de cada aislamiento fueron comparados buscando algún grado de relación entre ellos, examinando y comparando número y tamaño de bandas, así como la ubicación o desaparición de fragmentos entre sus perfiles. De esta forma, se construyó un patrón que reúne todas las posiciones en las que se encuentran las bandas. Posteriormente, se determinó un valor numérico para cada aislamiento, calculado por la razón entre el número de bandas compartidas entre las no compartidas en cada uno de los casos. Ese número es comparado entre todos los aislamientos, proporcionando finalmente una idea gráfica y numérica de la interrelación de los aislamientos. Este análisis se realizó utilizando el programa Pyelph (Pavel y Vasile, 2012).

Las relaciones epidemiológicas entre los aislamientos se describieron gráficamente utilizando el programa para filogenia Treecon para Windows (Van de Peer y De Wachter, 1994). El mismo permite la construcción y el dibujo de árboles filogenéticos basados en distancias evolutivas calculadas desde las secuencias de ácidos nucleicos. Para definir los patrones clonales se consideró que los aislamientos que comparten un 80% de similitud en su patrón de bandas pertenecen al mismo subtipo. Se construyeron los dendrogramas de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas; y en base a los mismos se seleccionaron 5 cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y 4 cepas procedentes de IIM subclínicas que se agruparon en diferentes patrones clonales o subtipos.

Las cepas aisladas de IIM subclínicas fueron seleccionadas de animales en los cuales la bacteria se aisló 3 veces a partir del mismo cuarto mamario durante un periodo de seis meses, por lo cual fueron consideradas cepas altamente adaptadas a la GM bovina (crónicas). La confirmación de que la misma cepa fue la que persistió en el cuarto mamario se realizó por PFGE utilizando la metodología previamente descrita. De los 21 aislados procedentes de IIM subclínicas, 7 (5a, 5b, 2, 20, 40, 68, 134) fueron confirmados en trabajos previos como cepas altamente adaptadas a la GM (crónicas) por

PFGE (datos no publicados) por lo cual la comparación de sus perfiles genéticos en los tres aislamientos sucesivos no fue incluida en la presente tesis. Los 14 aislados restantes corresponden a 5 animales con IIM subclínicas de los cuales se aisló el microorganismo en 3 muestreos sucesivos (cepas 1595a, 1595b, 1595c, 316a, 316b, 316c, 5128a, 5128b, 5128c, 5011a, 5011b, 5011c) y dos muestreos sucesivos (cepas 1570a y 1570b) en un periodo de 6 meses. La confirmación de que los aislamientos sucesivos del mismo animal corresponden al mismo clon se muestra en la sección de resultados (Figura 16).

3.4. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

Las pruebas se realizaron sobre las 15 cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y 12 cepas altamente adaptadas a la GM bovina, procedentes de IIM crónicas, previamente analizadas mediante PFGE.

a) Antimicrobianos

Los discos de antimicrobianos utilizados en las pruebas de difusión en agar fueron almacenados a -20°C y llevados a temperatura ambiente una hora antes de su uso para evitar la condensación. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: Discos Oxoid: penicilina (10 UI); tetraciclina (30 μg); enrofloxacin (5 μg); trimetoprim-sulfa (1,25/23,75 μg). Disco Britania: fosfomicina (50 μg).

b) Pruebas de difusión en agar

Las pruebas de difusión agar se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Se utilizó agar Mueller-Hinton (Britania, Buenos Aires) como medio de prueba distribuido en placas de Petri de 90 mm de diámetro hasta un nivel de 4 mm de profundidad. Las placas fueron preparadas y conservadas a 8°C hasta su utilización dentro del mismo día o hasta 5 días desde la preparación. El pH fue regulado a 7,2-7,4 a temperatura ambiente y la esterilidad de cada lote fue controlada incubando una placa 24 horas a 35°C . La humedad excesiva en la superficie del medio antes de su uso fue eliminada por previa incubación a 35°C durante 10 a 30 minutos. El estándar de turbidez del inóculo fue ajustado al 0,5 de la escala Mc Farland que corresponde a una suspensión de aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Los aislamientos fueron descongelados a temperatura ambiente, tomándose una ansada del caldo que fue inoculada por agotamiento en superficie en agar sangre ovina al 5%, incubándose a 35°C por 18 a 24 horas para observación de desarrollo y control

de pureza. A partir de este cultivo, se inocularon 2 a 3 colonias en caldo tripteína soya (Britania), el cual fue incubado a 35°C por 3 a 5 horas, hasta lograr ajuste de turbidez compatible con el estándar 0,5 de Mc Farland. Inmediatamente después de ajustado el inóculo se sembraron las placas de agar Mueller-Hinton con un hisopo estéril, presionando el mismo contra las paredes del tubo con el fin de escurrir el exceso de medio. Sobre la superficie seca del agar se desplazó el hisopo en tres direcciones para asegurar una completa distribución del inóculo. Se esperaron 5 minutos antes de aplicar los discos con antibióticos para absorber el exceso de humedad.

c) Realización de la prueba, lectura de las placas e interpretación de resultados

Se colocaron los discos seleccionados sobre la superficie del agar inoculada, con pinza de disección estéril aplicando una ligera presión, a una distancia no menor de 24 mm desde un centro a otro de cada disco aplicando no más de 5 discos por placa. Las placas se incubaron invertidas a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos en atmósfera ambiental. Después de 18 horas de incubación las placas fueron examinadas y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición. En la lectura se tuvieron en cuenta las áreas que no mostraron desarrollo obvio a ojo desnudo, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas detectadas en el borde de la zona. Se tuvieron en cuenta las zonas de inhibición uniformemente circulares y desarrollo confluyente. Los tamaños de las zonas de inhibición fueron interpretados según estándares de CLSI (2008). La cepa de referencia utilizada para control de calidad del ensayo (rangos para susceptibilidad en mm para test del disco) fue *S. aureus* ATCC 25923.

d) Resistencia a penicilina

Sobre aquellos aislamientos que se mostraron resistentes a la penicilina se determinó producción de β -lactamasa de acuerdo con el método de la cefalosporina cromogénica (DrySlide Nitrocefin, Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.). La cefalosporina cromogénica, nitrocefin, se ha encontrado efectiva para detectar todas las β -lactamasas conocidas, incluyendo las penicilinasas estafilocócicas. Previamente a la realización del test de β -lactamasa, se indujo la producción de la enzima por crecimiento de las cepas en agar sangre ovina al 5% con un disco de 1 μ g de oxacilina (Britania) tomando para la prueba ulterior el crecimiento cercano al disco o al límite de la zona de inhibición (Thornsberry, 1985). El disco utilizado está impregnado con la cefalosporina cromogénica nitrocefin, que exhibe un cambio de color muy rápido de

amarillo a rojo cuando la amida unida al anillo β -lactámico es hidrolizada por una β -lactamasa. Cuando una bacteria produce esta enzima en cantidades significativas, el disco amarillo se torna rojo en el área donde el microorganismo es aplicado. No se reconoce que nitrocefín reaccione con otras enzimas. Los discos de nitrocefín fueron conservados a -80°C hasta su uso. Para realizar la prueba los discos fueron retirados del congelador y permanecieron a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Luego fueron humedecidos con una gota de agua destilada estéril. Con un ansa estéril se tomó material de la colonia a evaluar y se colocó sobre el disco, que fue controlado para observar cambios de color. Una reacción positiva fue indicada por cambio de color de amarillo a rojo en el área donde se aplicó el cultivo. Un resultado negativo fue indicado por ausencia de cambio de color en el disco. Cada grupo de aislamientos fue evaluado junto con *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo.

3.5. Evaluación de la presencia de genes de adherencia, formación de biofilm, polisacáridos capsulares y resistencia a penicilina en el genoma de *S. aureus*

El análisis se realizó sobre las 15 cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y 12 cepas procedentes de IIM subclínicas (crónicas). La identificación de los genes de interés se realizó por PCR, previa puesta a punto de la concentración de MgCl_2 y cantidad (ng) de ADN. Finalmente, en un volumen de reacción de 10 μl se colocaron 100 ng de ADN genómico como molde. Las condiciones de ciclado fueron las mismas para los genes de adherencia y formación de biofilm que se han descrito para la caracterización molecular de *S. aureus* teniendo en cuenta la temperatura de unión (temperatura de annealing) específica para cada par de oligonucleótidos iniciadores o primers (Invitrogen).

Las condiciones para los genes que codifican para la expresión de cápsula (*cap5* y *cap8*) y el gen *blaZ* fueron diferentes. Las concentraciones finales de los reactivos se detallan en la Tabla 6. El detalle de cada par de cebadores se encuentra en las Tablas 7, 8 y 9.

Tabla 6: Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación junto a la concentración final utilizada para un volumen total de 10 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
dNTP (25 mM)	0,25 mM
Taq (5 U/µl)	0,06 U/µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
Oligonucleótidos	0,4 µM

Tabla 7: Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes de adherencia y formación de biofilm. Se detalla la cantidad de ciclos como también la duración (en minutos) y la temperatura aplicada.

Etapa de ciclado		Condiciones
Desnaturalización inicial		96°C - 3 min
	Desnaturalización	95°C - 30 seg
Amplificación (30 ciclos)	Hibridación	55°C - 30 seg
	Extensión	72°C - 1 min
Extensión final		72°C - 2 min

Tabla 8: Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes capsulares (cap5 y cap8). Se detalla la cantidad de ciclos como también la duración (en minutos) y la temperatura aplicada.

Etapa de ciclado		Condiciones
Desnaturalización inicial		94°C - 5 min
	Desnaturalización	94°C - 30 seg
Amplificación (30 ciclos)	Hibridación	50°C - 30 seg
	Extensión	72°C - 1 min
Extensión final		72°C - 5 min

Tabla 9: Etapas del programa de amplificación utilizado para el gen bla_Z. Se detalla la cantidad de ciclos como también la duración (en minutos) y la temperatura aplicada.

Etapa de ciclado		Condiciones
Desnaturalización inicial		94°C - 3 min
	Desnaturalización	94°C - 30 seg
Amplificación (30 ciclos)	Hibridación	55°C - 30 seg
	Extensión	72°C - 1 min
Extensión final		72°C - 10 min

Los resultados se visualizaron al correr 10 µl de los productos de amplificación en geles de agarosa preparados como se describió anteriormente (Apartado 3.3.1.c). El porcentaje de agarosa utilizado dependió de la longitud de los fragmentos: 3% para secuencias de hasta 150 pb, 2% para extensiones entre 150-250 pb y 1% para el caso del fragmento de 971 pb. En la Tabla 10 se resumen las características generales de los pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos de genes de adherencia, formación de biofilm, PC y resistencia a penicilina de *S. aureus*.

Tabla 10: Características generales de pares de cebadores utilizados para amplificar fragmentos de genes de *S. aureus*. Ta: Temperatura de annealing.*Pares de oligonucleótidos diseñados específicamente para este trabajo con el programa Primer Blast.

Primer	Secuencia (5'-3')	Ta(°C)	Gen que amplifica	Longitud fragmento	Referencia
clfA-MW0764	F-TTACGAATCAGTTGACGAATGTG R-AGGCACTGAAAAACCATAATTCA	55	Clumping factor A	104 pb	(Le Maréchal y col., 2011)
clfB	F-TGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAC R-CCGTCGGTTGAGGTGTTTCATTG	62	Clumping factor B	194 pb	(Klein y col., 2012)
fnbA	F-CGACACAACCTCAAGACAATAGCGG R-CGTGGCTACTTCTGATGCCGTTTC	62	Fibronectin binding protein A	133 pb	(Klein y col., 2012)
fnbB	F-ACGCTCAAGGCGACGGCAAAG R-ACCTTCTGCATGACCTTCTGCACCT	62	Fibronectin binding protein B	197 pb	Diseñados*
icaA	F-CTTGCTGGCGCAGTCAATAC R-CCAACATCCAACACATGGCA	55	Intercellular adhesion A	178 pb	Diseñados*
icaD	F-CGCTATATCGTGTGCTTTTGGGA R-TCGCGAAAAATGCCCATAGTT	55	Intercellular adhesion D	164 pb	Diseñados*
icaC	F-CTTGGGTATTTGCACGCATT R-GCAATATCATGCCGACACCT	55	Intercellular adhesion C	209 pb	Diseñados*
Fib	F-CGTCAACAGCAGATGCGAGCG R-TGCATCAGTTTTCGCTGCTGTTT	62	Fibrinogen binding protein	239 pb	(Atshan y col., 2013)
Cna	F-AATAGAGGCGCCACGACCGT R-GTGCCCTCCCAAACCTTTGAGCA	62	Collagen Adhesin	156 pb	(Atshan y col., 2013)
Bap	F-CCCTATATCGAAGGTGTAAGTTGCAC R-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	60	Biofilm-associated protein	971 pb	(Cucarella y col., 2001)
Cap5k1 Cap5k2	F-GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG R-CTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG	50	Polisacárido capsular 5	361 pb	(Verdier y col., 2007)
Cap8k1 Cap8k2	F-GCCTTATGTTAGGTGATAAACCC R-GGAAAAACACTATCATAGCAGG	50	Polisacárido capsular 8	173pb	(Verdier y col., 2007)
BlaZ	F-AAGAGATTTGCCTATGCTC R-GCTTGACCACCTT TTATCAGC	55	Beta-lactamasa	520pb	(Vesterholm-Nielsen y col., 1999)

3.6. Ensayos de internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).

Los ensayos de internalización en la línea de células epiteliales de glándula mamaria bovina (MAC-T) (del inglés: Transformed mammary epithelial cells) (Huynh y col., 1991) se realizaron siguiendo la metodología de Almeida y col. (1996) con modificaciones. Para los mismos se emplearon los aislados N°: 17, 48, 61, 247 y 358 (provenientes de IIM clínicas) y los aislados N°1595, 5128,316 y 5011 (provenientes de IIM subclínicas crónicas).

En forma previa a los ensayos in vitro se realizó la puesta a punto y recuento en placa de las UFC a emplear, a los efectos de utilizar una relación bacteria/célula MAC-T (del inglés multiplicity of infection, MOI) similar para todas las cepas a ser evaluadas. Para ello se preparó una suspensión con la bacteria seleccionada y se realizó la lectura con un densitómetro hasta obtener una turbidez equivalente a escala de 0,5 Mc Farland (aprox. 10^8 UFC/ml). Con la suspensión madre se realizaron diluciones en base 10. Veinte μ l de las últimas cuatro diluciones fueron sembrados por duplicado en placas con agar sangre e incubados en estufa a 37°C por 24 hs. Los recuentos de las UFC se realizaron en las diluciones donde fue posible contar entre 30 y 40 UFC, dependiendo de la cepa. Una vez estandarizado el número de UFC/ml correspondiente a una suspensión al 0,5 Mc Farland, se comenzó con los ensayos de internalización.

Para la selección de la relación bacteria/célula a utilizar se realizaron ensayos de internalización por triplicado con diferentes MOIs (300, 200, 100, 50 y 20) utilizando dos cepas de *S. aureus* (358 y 25). A partir de los resultados obtenidos se procedió a seleccionar la MOI de 100 para la realización de los ensayos de internalización con los 9 aislados de *S. aureus* previamente seleccionados. La elección de la MOI de 100 se basó en que los porcentajes de internalización obtenidos se repitieron con pequeñas variaciones en los diferentes ensayos realizados, mientras que con las MOI de 300, 200, 50 y 20 se observaron bajos porcentajes de internalización así como una baja repetibilidad de los resultados entre ensayos. Los promedios y desvíos estándar (DE) de los porcentajes de internalización con las diferentes MOI empleadas se muestran en el **Anexo II**.

Posteriormente, suspensiones de las 9 cepas seleccionadas fueron co-cultivadas con una monocapa confluyente de células MAC-T en medio D-MEM (**Anexo I**) a una MOI de 100 durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El número de células

epiteliales por pocillo fue estimado contando en un hemocitómetro para determinar la razón bacteria/célula epitelial en el estudio de invasión. Paralelamente, se sembraron estos inóculos iniciales por triplicado en placas de agar sangre para conocer cuántas UFC/ml fueron las que inicialmente se pusieron en contacto con las células. Estos inóculos permanecieron en estufa a 37°C durante 2 hs, para luego realizar el sembrado en placa y posterior recuento de UFC/ml. Este procedimiento permitió calcular el crecimiento de las diferentes cepas durante 2 hs en el medio de cultivo de las MAC-T y establecer diferencias entre las mismas. Posteriormente al co-cultivo, los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados como muestras de “bacterias no internalizadas” y las monocapas celulares fueron lavadas tres veces con PBS 1X pH 7,4 y tratadas con gentamicina (Sigma) 100 µg/ml en medio D-MEM a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 2 horas para eliminar las bacterias no internalizadas. Luego se colectaron los sobrenadantes y se sembraron en placas con ATS con el adicional de 5% de sangre de ternero para verificar la muerte bacteriana por gentamicina. Por último, las monocapas de células MAC-T fueron lavadas tres veces con PBS 1X, tratadas con tripsina 0,25%-EDTA 0,1% (Gibco BRL), y además lisadas con Tritón X-100 (Amersham) en una concentración final de 0,025% (v/v) en agua destilada estéril para liberar los estafilococos intracelulares. Posteriormente, se recolectó el lisado de las MAC-T más las bacterias internalizadas. Las UFC/ml de *S. aureus* asociadas a las células MAC-T fueron determinadas por la técnica estándar de recuento en placa desarrollada por Miles y col. (1938). Cada ensayo se realizó por triplicado y se repitió 5 veces como mínimo. La invasión se expresó como el porcentaje de bacterias presentes dentro de las células epiteliales, comparado con el número total de bacterias inicialmente utilizadas para infectar a las MAC-T (100%), aplicando la fórmula que se presenta al pie.

Como control negativo (0% de invasión) se empleó la cepa de *Escherichia coli* DH5α, la cual es incapaz de invadir CEM bovinas.

$$\% \text{ internalización} = \frac{N^{\circ} \left(\text{Bacterias recuperadas de cél. MAC - T} / \text{ml} \right)}{N^{\circ} \left(\text{Bacterias usadas para infectar cél. MAC - T} / \text{ml} \right)} \times 100$$

El análisis estadístico de los datos se efectuó mediante el software SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc.®). Se utilizó ANOVA simple para determinar las diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de internalización de las

diferentes cepas evaluadas. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Posteriormente, se utilizó el test de comparaciones múltiples Duncan para identificar cuales grupos diferían entre sí en forma significativa. La comparación de las medianas del \log_{10} UFC/ml obtenidas luego de 2 hs de cultivo de las diferentes cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas se efectuó mediante el test de Mann Whitney. El nivel de significancia se fijó en $P < 0,05$.

3.6.1. Extracción de ARN mensajero (ARNm) bacteriano

La purificación de ARNm se realizó sobre el total de las 10 cepas evaluadas mediante ensayos de invasión celular, resultando en nueve aislados de *S. aureus* y uno de *Escherichia coli* DH5 α como control negativo de internalización.

De cada aislado estudiado, se extrajo ARNm de muestras tomadas en 3 etapas diferentes del ensayo de internalización: cultivos bacterianos que no estuvieron en contacto con células del hospedador (grupo control), del sobrenadante del co-cultivo de bacterias con células MAC-T (bacterias no internalizadas) y del lisado de las células (bacterias internalizadas). Las muestras se almacenaron a -80°C en RNAlater para la posterior extracción de ARN bacteriano.

Para la extracción de ARN total a partir del grupo control, del grupo de bacterias no internalizadas y del grupo de bacterias internalizadas se utilizó el kit comercial RiboPure™-Bacteria (Ambion) el cual contiene esferas capaces de fragmentar mecánicamente la gruesa pared celular de bacterias Gram (+) como *S. aureus*. Posteriormente, al grupo de bacterias internalizadas, se le aplicó el kit comercial MICROBEnrich™ (Ambion) para purificar el ARNm bacteriano a partir del ARN total conteniendo material genético eucariota, extraído previamente de la mezcla *S. aureus*-MAC-T. Para ambos procedimientos se siguieron los protocolos especificados por los correspondientes fabricantes.

3.6.2. Retrotranscripción (RT)

Para la obtención de ADN copia (ADNc) a partir de ARNm se utilizó un termociclador TECHNE TC-312 (Stone, Reino Unido), la enzima MMLV-RT (Transcriptasa Reversa del Virus Moloney de la Leucemia Murina) (Invitrogen) y cebadores hexanucleótidos con secuencias al azar siguiendo la metodología empleada por Dallard y col. (2011). Se tomó un volumen constante de 11,85 μl de la muestra. Los

volúmenes de los reactivos junto a sus concentraciones finales necesarios para cada muestra se detallan en la Tabla 11. No fue necesario el tratamiento previo de la muestra con ADNasas debido a que el mismo se encuentra incluido en los kits de extracción de ARN previamente descriptos

En primer lugar se preparó una mezcla de reacción conteniendo los oligonucleótidos al azar o Random Primers y dNTPs (Invitrogen). Ésta fue separada en alícuotas y posteriormente se agregó el ARNm para su incubación 5 minutos a 65°C. A continuación una segunda mezcla conteniendo buffer MMLV (Invitrogen), DTT [Ditiotreitol] (Invitrogen) e inhibidor de ribonucleasas RNAout (Invitrogen) se agregó a la preparación anterior y se incubó a 37°C durante 2 minutos. Finalmente se adicionó la retrotranscriptasa MMLV y se continuó con el ciclo final de retrotranscripción que consta de incubación 10 min a 25°C, 50 min a 37°C y 15 min a 70°C.

Tabla 11: Reactivos empleados en el protocolo de retrotranscripción. Se detallan las concentraciones finales y los volúmenes necesarios por cada muestra.

Reactivo	Concentración final	Volumen
Random primers (1µg/µl)	0,02 µg/µl	0,25 µl
dNTP (25 mM)	0,8 mM	0,4 µl
Buffer MMLV (5X)	1X	4 µl
DTT (100 mM)	10 mM	2 µl
RNA out (40 U/µl)	1 U/µl	0,5 µl
MMLV-RT (200 U)	10 U	1 µl

La cuantificación de la concentración de ADN simple cadena (ADNsc) obtenida se llevó a cabo por un método fluorimétrico Quant-iT™ MssDNA Assay Kit (Qubit™, Invitrogen) con el fin de utilizar luego una cantidad constante para la técnica de amplificación de ADN en tiempo real para cada cepa y muestra correspondiente.

3.6.3. Evaluación de los niveles de expresión relativa de genes de adherencia y formación de biofilm de *S. aureus* en un modelo de infección in vitro.

El objetivo de evaluar la expresión de genes de adherencia de *S. aureus* utilizando un modelo de infección in vitro en células MAC-T fue comparar la expresión de los mismos en las diferentes condiciones, es decir, en bacterias que lograron la internalización a células epiteliales mamarias y las que no lo hicieron.

Para ello, una monocapa de células MAC-T se co-cultivó con cada aislado seleccionado de *S. aureus* durante 2 horas. Una vez cumplido este tiempo se separaron dos fracciones: por un lado el sobrenadante del co-cultivo donde se encontraron las bacterias no internalizadas, y por otro lado la monocapa de células MAC-T con las bacterias que lograron la invasión. Ambas fracciones celulares se conservaron en una solución estabilizadora RNA later™ (Ambion).

Para los estudios de expresión se realizó la extracción de ARNm de ambas fracciones experimentales obtenidas del co-cultivo. Asimismo se purificó ARNm a partir de una suspensión bacteriana del mismo aislado de *S. aureus* utilizado para el co-cultivo que no estuvo en contacto con células MAC-T, por lo que fue conservada como muestra control.

Los estudios de expresión relativa se realizaron por PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR), una técnica de elevada sensibilidad que permite analizar transcritos poco frecuentes y pequeños cambios en la expresión de genes (Pfaffl, 2001). La detección de los nuevos productos sintetizados utiliza una mezcla de reacción comercial que además de la enzima Taq ADN polimerasa, Mg^{+2} y buffer, contiene un fluorocromo que se une específicamente al ADN doble cadena. Por otra parte, el método de cuantificación a aplicar depende de la secuencia target, cantidad de material genético en la muestra, grado de precisión requerido, entre otros factores. En este caso se optó por el método de cuantificación relativa que se basa en la expresión relativa del gen target respecto a uno de referencia. La razón de expresión relativa (R) es utilizada para investigar cambios en la expresión génica. Lo que en este caso significaría comparar la variación de expresión de un gen target en muestras experimentales (bacterias internalizadas o no internalizadas obtenidas del co-cultivo), respecto a la muestra control correspondiente a bacterias que nunca entraron en contacto con células MAC-T. Para poder evaluar la variación de expresión del gen target, el gen normalizador debe mantener expresión constante en las diferentes condiciones evaluadas, por ende, su estabilidad debe ser estudiada en las condiciones particulares del ensayo planteado. Además se debe tener en cuenta la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos empleados tanto para amplificar el gen de referencia como el/los target, ya que de no ser así los valores R calculados reflejarían resultados erróneos.

3.6.3.1. Evaluación y selección del gen estándar interno para PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para llevar a cabo el estudio de expresión de genes target por RT-qPCR se optó por el método de cuantificación relativa. El mismo emplea un gen estándar interno (housekeeping) para normalizar los valores de ciclo umbral o threshold cycle (C_T) de genes target. El valor de C_T corresponde al ciclo de amplificación en el cual la intensidad del marcador fluorescente presente en la mezcla de reacción con capacidad de intercalarse en el ADN doble cadena generado, se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de PCR en tiempo real; también definido como el ciclo en el cual la emisión de fluorescencia cruza el umbral establecido. Este valor, por ende, resulta inversamente proporcional a la cantidad de copias del transcripto a evaluar en la muestra original.

La existencia de un gen estándar interno permite normalizar los valores de C_T del gen target en relación a las variaciones inter-ensayo y a la cantidad de material de partida debido a la inestabilidad de las moléculas de ácidos nucleicos (Vandesompele y col., 2002). Se espera que su nivel de expresión sea constante en el tiempo y frente a la variación de las condiciones ensayadas. La desventaja de esta metodología reside en el hecho de encontrar aquel gen adecuado ya que en bacterias la expresión génica es muy variable respecto a la etapa de crecimiento y también en cuanto a las condiciones medioambientales debido su capacidad de adaptación (Chung y col., 2013). Por este motivo, con el objetivo de escoger un gen que permita la normalización de las reacciones de RT-qPCR, se debe verificar la estabilidad de expresión de los genes candidatos en cada situación experimental particular (Pfaffl, 2004; Vandesompele y col., 2009).

3.6.3.2. Amplificación por PCR mediante oligonucleótidos pre-seleccionados

A fin de definir un gen como estándar interno o housekeeping adecuado para la normalización de los resultados de expresión de los genes de interés, se analizaron tres posibles pares de oligonucleótidos que amplifican fragmentos específicos de *S. aureus*. En primera instancia se ensayó un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 116 pb del gen que codifica para ARN ribosómico 16S bacteriano (ARNr 16S) (Tabla 12). Para la detección del transcripto por PCR convencional se colocaron 2 μ l de las mezclas de retrotranscripción conteniendo ADNc, en 10 μ l de volumen final. Los reactivos se detallan en la Tabla 13 junto a la correspondiente concentración final

empleada en cada caso. Las etapas y condiciones de ciclado son las mismas que se han descrito anteriormente (Apartado 3.3.1.b., Tabla 5). Se evaluaron dos controles, un blanco de reactivos en el cual se reemplazó el ADNc bacteriano por agua Milli-Q estéril y otro control en el que se colocó ADNc de una muestra de GM bovina (para evaluar posible contaminación con ADN bovino).

Tabla 12: Características generales del par de primers empleados para amplificar una sección del gen codificante para ARNr 16S bacteriano.

Primer	Secuencia (5'-3')	Ta (°C)	Longitud (nucleótidos)	Long. del fragmento	Referencia
16S-F	TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG		24		Ster y col., 2005
16S-R	TCATCGTTTACGGCGTGGACTACC	62	24	116 pb	

Tabla 13: Detalle de reactivos y concentraciones empleados en la amplificación del fragmento codificante para ARNr 16S bacteriano en muestras de ADNc de *S. aureus*.

Reactivo	Concentración final
Buffer 10X	1X
dNTP 25 mM	0,25 mM
MgCl ₂ 25 mM	2 mM
Taq Pol 5 U/μl	0,06 U/μl
16S- F 4 μM	0,4 μM
16S- R 4 μM	0,4 μM

Posteriormente se evaluaron por RT-qPCR otros dos pares de oligonucleótidos. Uno de ellos fue aquel aplicado en la caracterización molecular del microorganismo (Apartado 3.3.1.b., Tabla 3) basado en el estudio de Martineau y col. (1998) que amplifican un segmento correspondiente a un gen de la familia de proteínas glutamina sintetasas. La elección del segundo par de primers a evaluar se realizó a partir de un sondeo bibliográfico. Se encontró ampliamente utilizado en estudios de expresión génica aquel conjunto que amplifica un fragmento del gen codificante para la subunidad B de la enzima ADN girasa, cuyas características se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Detalle del conjunto de oligonucleótidos amplificantes del segmento que codifica para ADN girasa-subunidad B de *S. aureus* para su análisis como gen estándar interno.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Ta (°C)	Longitud (nucleótidos)	Longitud del fragmento	Referencia
GyrB-F	CCAGGTAAATTAGCCGATTGC	55	21	121 pb	Rudkin y col., 2012
GyrB-R	AAATCGCCTGCGTTCTAGAG		20		

Para la amplificación se utilizó un termociclador StepOne v2.1 (AppliedBiosystem) y Mezcla Real 5X (Biodynamics) en una concentración final de 1X. Esta mezcla comercial posee Taq ADN Polimerasa, dNTPs, Mg⁺², conservantes, buffer y fluorocromo verde para la detección de los productos. Se realizaron duplicados de cada punto a evaluar. Para el diseño del programa de amplificación que se muestra en la Tabla 15, se tuvo en cuenta la correspondiente temperatura de annealing de cada par de primers, cuya concentración final fue 0,4 µM. Se colocaron 1,4 ng de ADNc en cada tubo de reacción y agua Milli-Q en el caso del control negativo. Las muestras analizadas correspondieron tanto al material genético de las bacterias en cultivo individual -control sin tratamiento- como también al perteneciente a las bacterias de los co-cultivos que se determinaron como condiciones experimentales por haber entrado en contacto con células del hospedador (fracciones internalizadas y no internalizadas)

Tabla 15: Etapas, duración y temperaturas empleadas para amplificar fragmentos de ADNc correspondientes a los posibles genes housekeeping por RT-qPCR. La Ta específica para cada par de oligonucleótidos se tuvo en cuenta en cada reacción de amplificación.

Etapas	Condiciones
Mantenimiento	15 min - 95°C
	15 seg - 95°C
Ciclado x 40	15 seg - Ta
	10 seg - 72°C (Lectura)
Mantenimiento	10 min - 72°C
	1 min - 60°C
Curva de fusión	15 seg - 95°C (Lectura cada 1°C)

3.6.3.3. Programa para la selección del gen estándar interno

Para efectuar una elección correcta, se evaluó la expresión de los genes candidatos en las tres condiciones mencionadas. Los valores de CT de las amplificaciones fueron

introducidos en una aplicación de Microsoft Excel, BestKeeper© Software tal como lo describió Pfaffl y col. (2004). La misma se encuentra disponible on-line y realiza tratamientos estadísticos sobre los valores introducidos. A partir del coeficiente de variación (CV) y DS obtenidos, se pudo determinar si la variación de la expresión de los posibles genes estándar internos o housekeeping fue o no significativa.

3.6.3.4. Cálculo de la eficiencia (E) de amplificación del gen housekeeping y genes target

Con el propósito de obtener los valores de E para cada par de oligonucleótidos se construyeron curvas estándares con diluciones seriadas (1/5) de la muestra. La misma, a fin de evitar sesgos en los resultados, constó de una mezcla de ADNc de los aislados que se mostraron más reproducibles en cuanto a la expresión del gen housekeeping.

Para cada curva se amplificó un total de 7 diluciones del pool de ADNc por duplicado, como así también un blanco de reacción en el cual se reemplazó el ADN por agua Milli-Q estéril. Los reactivos y las condiciones de ciclado fueron los mismos que se usaron para la amplificación de genes housekeeping (Apartado 3.6.3.2 Tabla 15). Para el tratamiento de los resultados se hizo uso del Software StepOne v2.1 del cual se extrajo el valor de la pendiente de la regresión lineal CT vs. Log [ADNc] para calcular el valor de E a partir de la fórmula descripta por Rasmussen (2001).

3.6.3.5. Cuantificación del nivel de expresión de genes de adherencia y de formación de biofilm de *S. aureus*

Una vez seleccionado el gen normalizador, se procedió a analizar por RT-qPCR las muestras correspondientes a los aislados seleccionados para evaluar la expresión de los genes target de interés.

a) Amplificación de genes target

Al igual que en las reacciones antes descriptas, se empleó un termociclador StepOne v2.1 (AppliedBiosystem), Mezcla Real (Biodynamics) y el mismo método de ciclado. La temperatura de annealing de cada par de oligonucleótidos se estableció individualmente para cada reacción, mientras que la concentración final de los mismos en la mezcla fue 0,4 μ M en todos los casos. Se incluyeron en el ensayo las cepas previamente seleccionadas, a partir de las cuales se obtuvieron las 3 muestras que corresponden al ADNc de bacterias sin tratar, al de las fracciones internalizadas y no

internalizadas. En cada tubo de reacción se colocaron aproximadamente 2,4 ng de ADNc como molde. Al igual que en el resto de las pruebas, cada punto se ensayó por duplicado; inclusive el blanco correspondiente a cada par de oligonucleótidos donde se colocó agua DEPC 0,1% en lugar de muestra.

b) Programa para el procesamiento de los resultados

Se empleó el Software disponible on-line REST 2009 V2.0.13 (Relative Expression Software Tool) como previamente fue descrito por Pfaffl (2001; 2002). Se ingresaron en esta plataforma los valores de E para cada par de primers como también los CT obtenidos para cada cepa en la situación control y en ambos tratamientos. En primer lugar la relación (R) entre cada situación experimental y el control fue calculada a partir de la ecuación desarrollada por el mismo autor que se presenta a continuación. Paso siguiente, a través de tratamientos estadísticos que forman parte del programa, se determinó si la misma resultó significativa.

$$R = \frac{(E_{Target})^{\Delta C_{T_{Target}} \text{ (control - muestra)}}}{(E_{Ref})^{\Delta C_{T_{Ref}} \text{ (control - muestra)}}$$

3.7. Curvas de crecimiento de S. aureus

Con el fin de aportar información que permita dilucidar una posible relación entre los perfiles de expresión génica de factores de adherencia, la capacidad de invadir células del epitelio mamario bovino y las características de las IIM causadas, se construyeron curvas de crecimiento de cada aislado de S. aureus.

Primeramente, las cepas conservadas a -80°C fueron reactivadas en cultivos sólidos y líquidos con medio ATS y CTS respectivamente como se ha detallado (**Anexo I**). Partiendo del cultivo líquido O/N (viene del término en inglés overnight) se inocularon al 1% con 0,5 ml de las suspensiones bacterianas, Erlenmeyers conteniendo 50 ml del mismo medio fresco. Los mismos se fraccionaron en 9 tubos estériles de 15 ml que correspondieron a los tiempos -cada 1 hora- a los que se midió el crecimiento para construir las curvas. Cada una de estas muestras, excepto aquella correspondiente a tiempo=0 hs, se cultivó a 37°C en agitación (150 rpm) hasta el momento de la medición.

A partir del tiempo cero, y a cada hora de incubación, se tomaron alícuotas de 100 µl de los cultivos y se realizaron diluciones seriadas 1/100 en microtubos conteniendo 900 µl de PBS 1X estéril. Fracciones de 100 µl de cada muestra se dispensaron sobre el medio agarizado y se esparcieron con una espátula de Drigalsky previamente sumergida en etanol 96% y flameada al mechero para realizar el cultivo sólido. Las placas se incubaron en estufa O/N a 37°C hasta realizar el recuento de las colonias. Teniendo en cuenta el dato de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) presentes en un cultivo ON de *S. aureus* (10^9 UFC/ml) es que se realizaron los cálculos pertinentes para escoger las diluciones a plaquar para cada tiempo de cultivo (Tabla 16).

Tabla 16: Diluciones realizadas de la suspensión celular de cada aislado a diferentes tiempos. En sombreado se indican las diluciones que fueron cultivadas en medio sólido.

		Diluciones						
	Tiempo (horas)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Tubo Falcon 1	0							
Tubo Falcon 2	1							
Tubo Falcon 3	2							
Tubo Falcon 4	3							
Tubo Falcon 5	4							
Tubo Falcon 6	5							
Tubo Falcon 7	6							
Tubo Falcon 8	7							
Tubo Falcon 9	8							

Una vez culminada la incubación ON de las placas, éstas fueron retiradas de la estufa para realizar el recuento de las colonias presentes y determinar las UFC/ml, según la ecuación:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{Número de Colonias}}{\text{Dilución} \times 0,1 \text{ ml}}$$

Con los datos experimentales, se construyó la gráfica $\log_{10} \text{UFC/ml}$ versus tiempo a fin de delimitar la fase exponencial de crecimiento de cada cepa. Una vez

establecida, se realizó una regresión lineal de dicho intervalo. La pendiente de tal recta corresponde al número de generaciones durante la fase exponencial:

$$\text{Pendiente de la recta} = \frac{\text{Número de Generaciones}}{\text{Tiempo de Fase Exponencial}} \quad (\text{A})$$

A su vez, el número de generaciones puede ser expresado como el cociente entre el tiempo de la fase exponencial de crecimiento y el tiempo de duplicación (TD) de la cepa bacteriana:

$$\text{Número de Generaciones} = \frac{\text{Tiempo de Fase Exponencial}}{\text{Tiempo de Duplicación}} \quad (\text{B})$$

Por lo tanto, si se igualan las ecuaciones A y B, es posible calcular el TD de cada una de las cepas bacterianas de la siguiente manera:

$$\text{Tiempo de Duplicación} = \frac{\text{Tiempo de Fase Exponencial}}{\text{Número de Generaciones}} \quad (\text{C})$$

Lo que equivale a decir:

$$\text{Tiempo de Duplicación} = \frac{1}{\text{Pendiente de la recta de crecimiento exponencial}} \quad (\text{D})$$

Pero teniendo en cuenta que el número de generaciones en la gráfica se presenta como \log_{10} , y que cada unidad logarítmica equivale a 3,25 generaciones, se debe dividir el TD obtenido por este valor para obtener un resultado real.

3.8. Diseño experimental de un modelo murino de infección intramamaria con *S. aureus*

3.8.1. Selección de las cepas a inocular en la glándula mamaria de ratón

La selección de las cepas de *S. aureus* a inocular en la GM murina se realizó según los siguientes criterios: procedencia (IIM clínica o subclínica), prevalencia y RCS promedio del tambo de origen, adaptación a la GM bovina según el tiempo de permanencia en el cuarto mamario afectado (baja o alta adaptación), susceptibilidad a los antimicrobianos, producción de enzimas, capacidad de producción de biofilm, capacidad de internalización a la célula epitelial mamaria bovina, prevalencia y expresión relativa de genes de adherencia, capacidad de crecimiento en cultivo, formación de biofilm, cápsula y resistencia a penicilina. Asimismo se tuvo en cuenta que las cepas se agruparan en diferentes patrones clonales o pulsotipos al análisis por PFGE, con un porcentaje de similitud <20%. En base a los criterios mencionados se seleccionaron los aislados N° 17 y 5128 de *S. aureus* y se los denominó cepa A y B, respectivamente.

La **cepa A (17)**, aislada a partir de leche de una vaca con IIM clínica, procedente de un tambo con alta prevalencia de *S. aureus* (62 %) y RCS promedio de 591.000 cél/ml, altamente difundida en el rodeo (confirmado por PFGE), resistente a la penicilina en las pruebas de susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos, productora de β -lactamasa, productora de α -hemolisina, con capacidad moderada (++) para producir biofilm, alta capacidad de invasión a las CEM ($7,45 \pm 0,72$ %), alta velocidad de duplicación en cultivo, presencia del gen *cap8*, *blaZ* y sobreexpresión in vitro de los genes *ClfA*, *FnbA*, *FnbB*, *IcaA* e *IcaD*.

La **cepa B (5128)**, aislada a partir de leche de una vaca con IIM subclínica (crónica) con alta adaptación a la GM bovina, estimada por su persistencia durante toda la lactancia en el mismo cuarto mamario, procedente de un tambo con baja prevalencia de *S. aureus* (1-3 %) y RCS promedio de 400.000 cél/ml, sensible a la penicilina por pruebas de susceptibilidad in vitro, productora de β -hemolisina, con alta (+++) capacidad de formar biofilm, baja capacidad de internalización a las CEM in vitro ($2,142 \pm 0,46$ %), baja velocidad de duplicación en cultivo, presencia del gen *cap5*, ausencia del gen *blaZ* y sobreexpresión in vitro de *FnbA* e *icaD*.

3.8.2. Animales

Se utilizaron ratones hembras preñadas de la cepa BALB/cJ de 6-8 semanas de edad con un peso aproximado 18-22 g, provenientes del Centro de Medicina Comparada

(ICIVET-Litoral). Los procedimientos con los animales experimentales se realizaron de acuerdo a las normas vigentes (NRC, 2011) y el protocolo fue analizado por el comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL.

3.8.3. Diseño experimental

La inoculación en GM de ratón de las cepas de *S. aureus* seleccionadas se realizó siguiendo un modelo de infección intramamaria (IM) validado para el estudio de la mastitis bovina (Brouillette y Malouin, 2005) y que ha sido utilizado y puesto a punto por miembros del grupo de trabajo (Calvinho y col., 1993; Beltramino y col., 2012).

Para constituir los grupos experimentales se utilizaron ratones hembras preñadas. Cinco a siete días después del parto, las madres en lactancia fueron separadas de sus crías y anestesiadas con ketamina (Ketalar, Parke-Davis) y xylazina (5 mg/kg; Rompun, Bayer).

Se utilizaron tres grupos de animales que fueron inoculados en las GM abdominales derechas (R4) e izquierdas (L4) con 100 µl de una suspensión bacteriana de las cepas A (grupo 1) y B (grupo 2) de *S. aureus*. El grupo 3 fue inoculado con 100 µl de solución fisiológica estéril (grupo control). Para la formación de cada grupo se utilizaron 30 ratones. Para la inoculación IM a través del conducto del pezón se utilizó una aguja 30G X 1/2 y una jeringa conteniendo 1×10^6 UFC/glándula en un volumen final de 100 µl. Dos horas posteriores a la infección, las madres retornaron con sus crías y permanecieron con ellas durante todo el experimento. Los grupos de hembras en lactancia fueron sacrificados a diferentes tiempos: 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216 y 264 horas post inoculación y en cada tiempo de muestreo se incluyeron 3 ratones (6 GM). Las GM L4 y R4 fueron asépticamente diseccionadas y removidas. Una porción del tejido mamario extraído fue homogeneizado en 2 ml de PBS 10x pH 7,2 para posteriormente evaluar el nivel de infección bacteriana. Otra porción del tejido fue fijada en formol bufferado al 4% para exámenes histológicos y por último otra parte fue inmediatamente conservada a -80°C hasta su procesamiento para la realización de RT-PCR en tiempo real. La porción de tejido extraída para evaluar el nivel de infección bacteriana fue la más próxima al pezón (sitio de inoculación), la porción extraída para exámenes histológicos fue el área central de la GM donde se ubica el nódulo linfoide principal y la porción para extracción de ARN fue la más profunda. En todos los sacrificios se practicó el mismo protocolo.

Cada grupo de ratones inoculados fueron examinados clínicamente en forma diaria hasta el día 11 post inoculación registrando cambios en el comportamiento, cambios en el pelaje y presencia de signos inflamatorios en la GM.

3.8.4. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

El recuento de colonias de *S. aureus* a partir del tejido mamario de los animales inoculados con las cepas A, B y controles se realizó por el método de dilución en placa (Larone, 1993). Para la obtención de la muestra, se extrajeron las glándulas mamarias en condiciones de esterilidad, se pesaron, se disgregaron en mallas metálicas y se resuspendieron en 2 ml de PBS 10x pH 7,2. Luego de obtenidas las muestras, 20 μ l de las suspensiones puras o diluidas 10 veces, se cultivaron por duplicado en placas de Petri con medio agar base (Britania). Las colonias desarrolladas (UFC) fueron contadas luego de 24 horas de cultivo a 37°C, expresándose los resultados como el Log del número total de colonias por gramo de órgano (Tuchscher y col., 2005). La inoculación IM y el procesamiento del tejido para la recuperación de las bacterias inoculadas se muestran en la Figura 9.

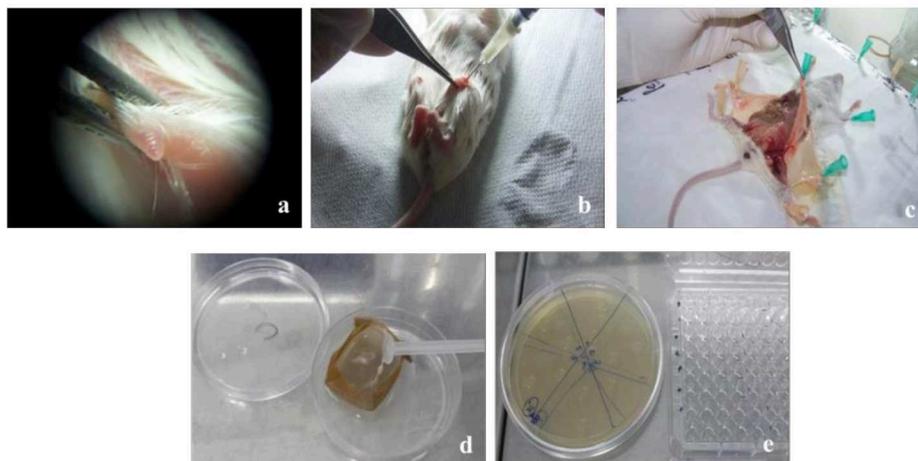


Figura 9: Inoculación intramamaria y procesamiento del tejido. **a)** Enfoque del pezón con microscopio (40x). **b)** Inoculación intramamaria. **c)** Extracción de las glándulas mamarias. **d)** Disgregación de la glándula mamaria en mallas metálicas estériles **e)** Dilución en placa y sembrado en placas Agar Base.

La recuperación de las bacterias inoculadas en la GM permitió evaluar si las cepas aisladas de casos de IIM clínicas y subclínicas (crónicas) mostraron diferencias en el tiempo de permanencia en el tejido mamario.

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó por ANOVA factorial que evalúa los efectos individuales del tratamiento y del tiempo de muestreo así como de la interacción entre ambos factores, utilizando el programa SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc.®). Para evaluar diferencias en la cantidad de bacterias recuperadas de la GM luego de la inoculación de las cepas A y B en cada punto del tiempo se utilizó la prueba t de student, previa comprobación de la igualdad de varianzas por el test de Levene.

3.8.5. Evaluación del daño tisular y reacción inflamatoria.

Para la evaluación histopatológica de las lesiones inducidas por las cepas A y B en la GM de ratón, las porciones de tejido mamario obtenidas fueron fijadas en formol-buffer 4 % durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente. Luego de un lavado prolongado en agua corriente y PBS 0,05M pH 7,5 las muestras se deshidrataron en concentraciones graduales crecientes de alcohol etílico, aclararon en xilol y embebieron en parafina siguiendo protocolos de rutina (Woods y Ellis, 1994).

Los tacos histológicos fueron cortados en un micrótopo rotativo manual. Los cortes seriados de 4 µm de espesor fueron montados en portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y secados durante 24 horas a 37°C. Para evaluar los cambios histopatológicos inducidos por las cepas A y B luego de la inoculación IM en los diferentes tiempos de sacrificio, los cortes se colorearon con la técnica de hematoxilina-eosina.

3.8.5.1. Coloración de hematoxilina-eosina.

Fundamento: es uno de los métodos más populares de tinción utilizado en histología y medicina diagnóstica. El método supone la aplicación de la tinción de hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas y el uso de eosina que tiñe componentes básicos gracias a su naturaleza aniónica o ácida

Procedimiento:

1. Xilol (A), 15 minutos.
2. Xilol (B), 10 minutos.
3. Alcohol 100 (A), 2 minutos.
4. Alcohol 100 (B), 2 minutos.

5. Alcohol 96, 2 minutos.
6. Alcohol 70, 2 minutos.
7. Agua destilada, 5 minutos.
8. Hematoxilina “Activada” BIOPUR®, 1-2 minutos.
9. Agua destilada, lavar.
10. Agua corriente, 2 minutos.
11. Agua destilada, 2 minutos.
12. Eosina, 1 minuto (BIOPUR®).
13. Agua destilada, 15 segundos.
14. Alcohol 70, 30 segundos.
15. Alcohol 96, 1 minuto.
16. Alcohol 100 (A), 1 minuto.
17. Alcohol 100 (B), 1 minuto.
18. Xilol (A), 3 minutos.
19. Xilol (B), 5 minutos.
20. Montaje

Interpretación de resultados:

- ❖ estructuras acidófilas se tiñen de rosado.
- ❖ estructuras basófilas se tiñen de azul.

3.8.6. Cuantificación de células inmunes en tejido mamario por inmunohistoquímica

Para la cuantificación de células inmunes en tejido mamario se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) que permite la localización de antígenos in situ utilizando anticuerpos específicos.

En la Tabla 17 se detallan los anticuerpos utilizados para identificar células inmunes en tejido mamario y las concentraciones de uso para cada uno. Para todos los antígenos se utilizó el método streptavidina-biotina-inmunoperoxidasa según descripciones previas (Dallard y col., 2009), con algunas variantes específicas en el procedimiento según el anticuerpo utilizado. Brevemente, las secciones de tejido fueron desparafinadas, hidratadas y tratadas con recuperación antigénica. La actividad de la peroxidasa endógena fue inactivada con 3% de H₂O₂ y las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero normal de cabra al 10%. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario 18 hs a 4°C, y luego por 30 minutos con el anticuerpo secundario universal (CystoScan™ HRP Detection System) a 25°C. La visualización del antígeno se realizó por el método streptavidina-peroxidasa (CystoScan™ HRP Detection System) utilizándose como cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) (BioGenex). Por último,

los cortes fueron lavados en agua destilada, contracolorados con hematoxilina (Biopur®), deshidratados y montados.

3.8.6.1. Procedimiento general de IHQ indirecta

- 1- Colocación de los cortes histológicos 10 minutos en la estufa a 60°C.
- 2- Desparafinización en xilol mediante dos pasajes consecutivos de 15 minutos cada uno.
- 3- Hidratación en una serie de alcoholes de graduación decreciente, a partir de etanol absoluto (dos pasajes de 3 minutos), etanol 96° (dos pasajes de 3 minutos) y finalmente etanol 70° (un pasaje de 3 minutos).
- 4- Hidratación en PBS pH 7,2 durante 5 minutos.
- 5- Tratamiento de recuperación antigénica. Se realizó en horno microondas o con enzimas dependiendo del anticuerpo primario utilizado. Según se detalla en la Tabla 17, para anti CD14 y CD79 se realizó por ebullición en horno de microondas de uso doméstico (potencia máxima 1200W). Como solución de recuperación se usó buffer citrato 0,01M pH 6,0. Los cortes fueron colocados en un vaso de coplin sumergido en un recipiente con agua y fueron sometidos a la siguiente secuencia de recuperación: 3 minutos a 100% de potencia, 6 minutos al 40%, recarga del vaso de coplin con agua destilada, 6 minutos al 40 % y 20 minutos dentro del microondas apagado. Para los anticuerpos CD4 y CD8 se utilizó Proteasa XIV 0,1M. Dejándolo con la enzima durante 5 minutos a 37° en cámara húmeda precalentada. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u en PBS.
- 6- Bloqueo de la actividad endógena de la enzima peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 10 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol absoluto, agregando nuevamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno a los 10 minutos.
- 7- Se realizaron dos lavados en PBS durante 5 minutos.
- 8- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos incubando 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda con una solución de suero normal de cabra al 5%.
- 9- Incubación con anticuerpo primario: se usó el anticuerpo de interés, según la proteína a detectar (Tabla 17) en la dilución adecuada toda la noche a 4°C (en heladera).
- 10- Después de la incubación con el anticuerpo primario la cámara se retiró de la heladera y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 11- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

12- Incubación con el anticuerpo secundario (Universal del kit Cytoscan HRP Detection System), durante 30 minutos a temperatura ambiente.

13- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

14- Incubación con complejo streptavidina (Cytoscan HRP Detection System Cell Mark) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

15- Se realizaron dos lavados consecutivos con PBS, 5 minutos cada uno.

16- Revelado de la reacción con 3-3'-diaminobencidina (Kit DAB BioGenx). Los cortes se observaron al microscopio para controlar el tiempo óptimo en cada prueba y estandarizarlo.

17- Se realizaron dos lavados con agua destilada, de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración de contraste con hematoxilina activada (Biopur®), deshidratación y montaje con bálsamo natural de Canadá (Canadax, Biopur®) y cubreobjetos apropiado.

Tabla 17: Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados, diluciones de uso, tipo de recuperación antigénica empleada, bloqueo, modo de incubación del anticuerpo primario y

Anticuerpos primarios	Clon	Dilución	Recuperación Antigénica	Bloqueo	Incubación	Proveedor comercial
CD8	CC63	1:75	Proteasa XIV 0,1M	SI	18 hs a 4°C	Serotec (MCA837G)
CD4	CC8	1:75	Proteasa XIV 0,1M	SI	18 hs a 4°C.	Serotec (MCA1653A647)
CD14	RPA-M1	1:150	Microondas	SI	18 hs a 4°C	Zymed (18-0121)
CD79	HM57	1:200	Microondas	SI	18 hs a 4°C	Abcam (ab 62650)
Anticuerpos secundarios						
Secundario	-	-	-		30 min a 25°C	CytoScan™
Universal						HRP Detection System.

3.8.6.2. Controles de la técnica.

Para verificar la especificidad de anticuerpos utilizados en la técnica de IHQ se realizaron diferentes controles:

Como control negativo se realizó la omisión del anticuerpo primario y del anticuerpo secundario biotinilado reemplazándolos por suero no inmune de conejo y ratón. Para excluir la posibilidad de la no supresión de la actividad de la peroxidasa endógena algunas secciones fueron incubadas solamente con el reactivo DAB.

Como control positivo para los diferentes anticuerpos primarios se utilizaron cortes histológicos de bazo y de ganglio linfático poplíteo de ratón los cuales fueron procesados y tratados con las mismas condiciones enumeradas en el apartado 3.8.6.1.

La homología entre el péptido diana de cada anticuerpo primario utilizado y la correspondiente homología con proteínas de ratón fue testada utilizando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Este procedimiento permitió determinar la localización del péptido y confirmar la especificidad antígeno-anticuerpo.

3.8.6.3. Análisis digital de imágenes y cuantificación de las células inmunes

Las imágenes de los preparados histológicos fueron digitalizadas mediante una cámara color de video CCD (Motic 2000, Motic China Group, China) montada a un microscopio de luz convencional (Olympus BH-2, Olympus Co., Japón) usando un objetivo 40X. Se digitalizaron campos microscópicos que cubrieron toda el área a analizar y se almacenaron bajo el formato TIFF con una definición de 1200 x 1600 pixels y 24 bits de color. Se realizó el análisis de las imágenes utilizando el programa Image-Pro Plus 3.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).

Los CD o “cluster de diferenciación” son proteínas estructurales de membrana clasificadas en series de superfamilias. Cada superfamilia se caracteriza porque las proteínas que la integran reúnen una serie de características estructurales comunes. El CD14 es un marcador principalmente de monocitos-macrófagos y en segunda medida de neutrófilos. Es un co-receptor para LPS bacteriano, prácticamente ausente en los granulocitos (Fainboim y Geffner, 2008). Los macrófagos fueron identificados como células grandes redondeadas con un diámetro entre 15-20 μm , con citoplasma abundante y con mayor cantidad de vacuolas y gránulos que el monocito.

Las moléculas CD4 y CD8 son glicoproteínas cuyos ligandos naturales son las moléculas del MHC de clase II y de clase I respectivamente. CD4 se expresa en la mayoría de los linfocitos T cooperadores, mientras la molécula CD8 se presenta, principalmente, en aquellos linfocitos T con función citotóxica. Los patrones de

marcación en ambas moléculas de adhesión, son las membranas citoplasmáticas de los linfocitos T. Los linfocitos son células pequeñas, de un diámetro de unos 7 μm , con un núcleo redondeado que ocupa casi toda la célula.

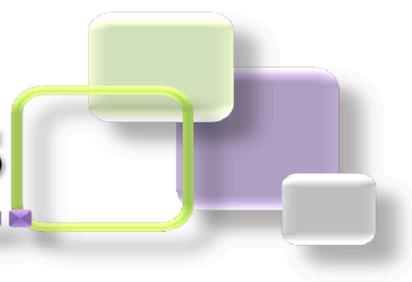
CD79 es una proteína transmembranal que forma un complejo con el receptor de linfocito B (BCR) y genera una señal después de que el BCR reconozca el antígeno, cuyo patrón de marcación es la membrana citoplasmática de linfocitos B y plasmocitos.

Para analizar la expresión de CD14, CD4, CD8 y CD79 en el tejido mamario, se digitalizaron imágenes de todo el preparado sometido a IHQ en un aumento de 40X y se cuantificaron las células positivas por imagen calculando la cantidad de células positivas por unidad de área (mm^2) según la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células positivas/mm}^2 = \frac{\text{Número de células positivas/campo microscópico}}{\text{Área total del campo microscópico } (\mu\text{m})} \times 1000000$$

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó por ANOVA factorial que evalúa los efectos individuales de los tratamientos aplicados y del tiempo de muestreo así como de la interacción entre ambos factores, utilizando el programa SPSS (versión 15.0 para Windows, SPSS Inc. [©]). Para evaluar diferencias en el número de células inmunes luego de los diferentes tratamientos aplicados en cada punto del tiempo se realizó ANOVA simple y posteriormente se utilizó el test de comparaciones múltiples Duncan para identificar cuales grupos diferían entre sí en forma significativa. Los supuestos del ANOVA, como normalidad de la distribución y homogeneidad de varianzas se comprobaron por los test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. El nivel de significancia se fijó en $P < 0,05$.

4. RESULTADOS



4.1. Caracterización fenotípica de las cepas de *S. aureus*

A partir de los criterios descriptos anteriormente en la sección Materiales y Métodos se seleccionaron 15 aislados de *S. aureus* provenientes de IIM clínicas y 21 aislados provenientes de IIM subclínicas de diferentes tambos de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires.

En el **Anexo II** se detallan las características relacionadas con la procedencia y el origen de las cepas, los datos epidemiológicos del rodeo de origen, RCS promedio del tambo y respuesta a la terapia antibiótica ante un protocolo estandarizado.

a) Prueba del Agar Manitol Salado (AMS)

La totalidad de los aislados se analizó fenotípicamente a través de la prueba bioquímica de cultivo en medio AMS.

Del total de los aislados caracterizados bioquímicamente mediante el cultivo en AMS, el 97,22% dieron un ensayo positivo mientras que la cepa N° 133 no produjo viraje de color en el medio (2,77%). Por otra parte, es de importancia aclarar que los aislados N° 61, 110 y 25 mostraron un crecimiento disminuido respecto al resto de los casos.

b) Observación del patrón de hemólisis

El 100% de las cepas evaluadas presentaron hemolisinas. De las 36 cepas evaluadas, 33 (91,66%) presentaron hemólisis α y 32 cepas (88,88%) presentaron hemólisis β . De las 15 cepas procedentes de IIM clínicas, 12 (80%) presentaron ambas hemolisinas (α y β) y 3 (20%) presentaron solo α -hemolisina (Tabla 18A). De las 21 cepas procedentes de IIM subclínicas, 18 (85,71%) presentaron ambas hemolisinas (α y β) y 3 (14,28%) presentaron solo β -hemolisina (Tabla 18B).

c) Prueba de la coagulasa

La mayoría de las cepas fueron capaces de formar un coágulo en el plasma de conejo pasadas las 4 hs y 8 hs, muy pocas tardaron las 24 hs. Sólo 6 cepas (16,66%) fueron capaces de coagular el plasma en forma completa, de modo que al invertirlo no se volcó ni se desplazó. El resto de las cepas formaron un pequeño coágulo en el plasma de conejo (83,33%).

d) Prueba de la catalasa

Todas las cepas resultaron catalasa (+). Al resuspender las colonias en peróxido de hidrógeno se pudo observar la formación de burbujas, demostrando así que fueron capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

Tabla 18A: Pruebas fenotípicas correspondientes a las cepas de *S. aureus* aisladas de IIM clínicas. AMS: agar manitol salado. α : hemolisina α . β : hemolisina β . Coagulasa. Catalasa. VP: prueba de Voges- Proskauer.

Nº Cepas	AMS	α	β	Coagulasa	Catalasa	V.P.
17	+	+		+	+	+
358	+	+		++++	+	+
48	+	+	+	++++	+	+
61	+	+	+	++++	+	+
247	+	+	+	+	+	+
364	+	+	+	+	+	+
110	+	+	+	+	+	+
14	+	+		+	+	+
322	+	+	+	+	+	+
117	+	+	+	+	+	+
293	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
133	-	+		+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+

Tabla 18B: Pruebas fenotípicas correspondientes a las cepas de S. aureus aisladas de IIM subclínicas. AMS: agar manitol salado. α : hemolisina α . β : hemolisina β . Coagulasa. Catalasa. VP: prueba de Voges- Proskauer.

Nº Cepas	AMS	α	β	Coagulasa	Catalasa	V.P.
1595a	+	+	+	+	+	+
1595b	+	+	+	+	+	+
1595c	+	+	+	+	+	+
316a	+	+	+	+	+	+
316b	+	+	+	+	+	+
316c	+	+	+	+	+	+
5128a	+		+	+	+	+
5128b	+		+	+	+	+
5128c	+		+	+	+	+
5011a	+	+	+	++++	+	+
5011b	+	+	+	++++	+	+
5011c	+	+	+	++++	+	+
1570a	+	+	+	+	+	+
1570b	+	+	+	+	+	+
5a	+	+	+	+	+	+
5b	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
134	+	+	+	+	+	+
68	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+

e) Producción de acetoína a partir de la glucosa (Prueba de Voges-Proskauer)

Luego de los 15 minutos de haber agregado el revelador al medio de cultivo, se pudo observar que todas las cepas viraron al color rojo, indicando la presencia de acetoína.

En la Tabla 18 (A y B) se presenta un resumen de la caracterización fenotípica (agar manitol salado, observación del patrón de hemólisis, prueba de la coagulasa, prueba de la catalasa y producción de acetoína) de las cepas de S. aureus seleccionadas

provenientes de animales con IIM clínicas y subclínicas. Los primeros 15 aislados corresponden a cepas obtenidas de bovinos con IIM clínicas y los 21 aislados restantes corresponden a cepas obtenidas de IIM subclínicas.

f) Ensayo en placa para evaluar la producción de biofilm

Se realizaron los ensayos a los 15 aislados que corresponden a cepas obtenidas de bovinos con IIM clínicas y a 12 aislados (de los 21) provenientes de bovinos con IIM subclínicas. Los 9 aislados restantes no se incluyeron en el ensayo debido a que se consideraron clonalmente idénticos luego de la tipificación molecular por PFGE que se muestra en el punto 4.3.2. En las Figuras 10 y 11 se muestra la representación de la detección de biofilm en cultivos en placa de poliestireno para las cepas estudiadas.

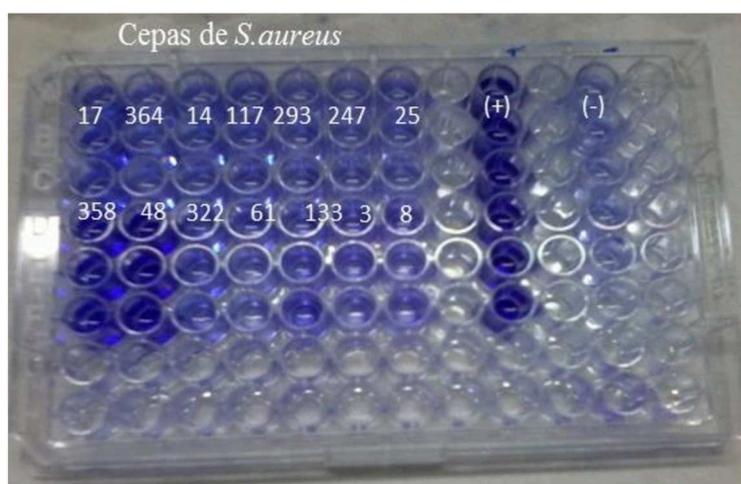


Figura 10: Representación de la detección de biofilm en placa de poliestireno de cepas provenientes de IIM clínicas. Cepa V329 (control +). Control negativo (-).

Por el método de microplaca para los 15 aislados de *S. aureus* provenientes de IIM clínicas se pudo observar que el 100% de los mismos fue capaz de producir biofilm. El 13,33%, representado por 2 cepas, fue capaz de producir biofilm en forma débil. El 40%, representado por 6 cepas, lo hizo en forma moderada, mientras que las 7 cepas restantes (46,66%) fueron fuertes productoras de biofilm. En la Figura 12 se representan las medias de las absorbancias obtenidas luego del cultivo en placas de poliestireno.

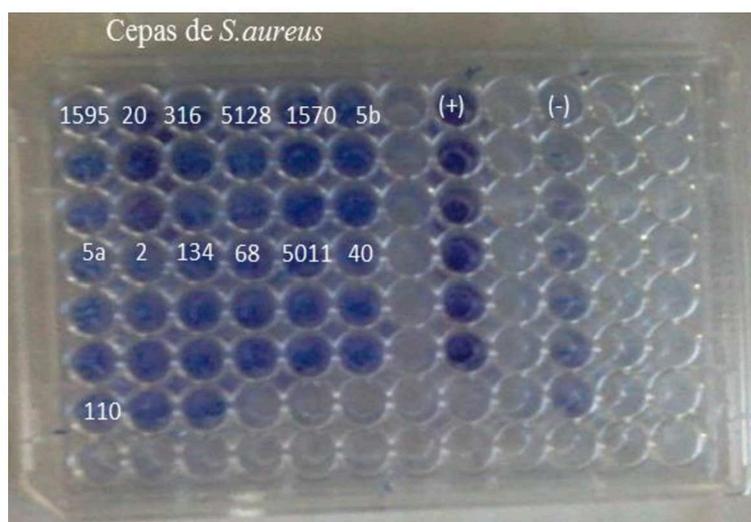


Figura 11: Representación de la detección de biofilm en placa de poliestireno de cepas provenientes de IIM subclínicas y de la cepa 110 proveniente de IIM clínica. Cepa V329 (control +). Control negativo (-).

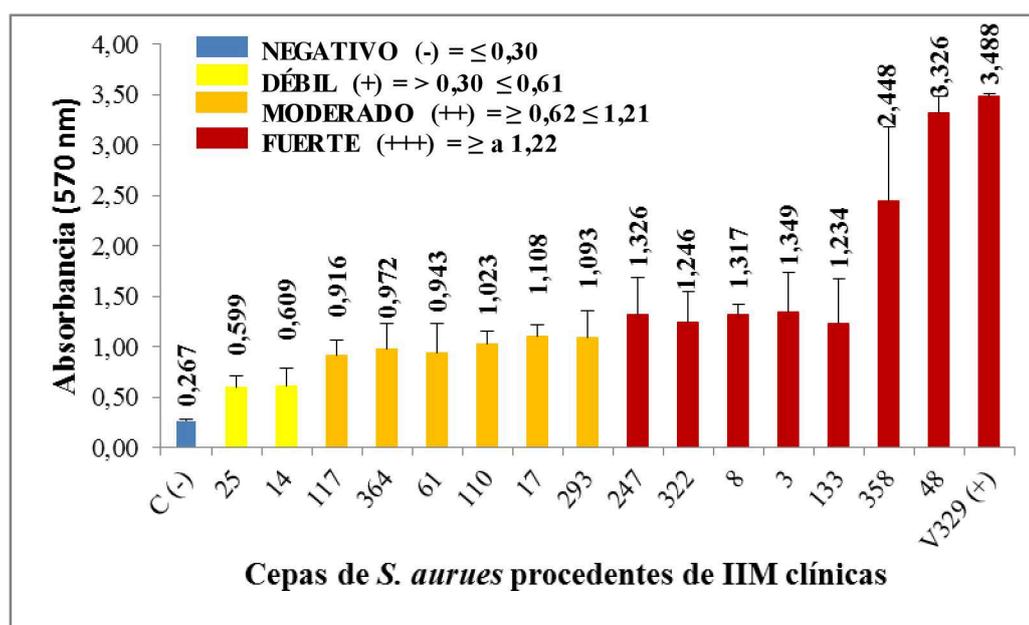


Figura 12: Representación de las medias de las absorbancias obtenidas del cultivo en placas de poliestireno de los aislados de *S. aureus* provenientes de IIM clínicas, del control negativo (-) y del control positivo (cepa V329 de *S. aureus*).

Para los 12 aislados provenientes de IIM subclínicas se pudo observar que el 100% de los mismos fue capaz de producir biofilm. El 41,66%, representado por 5 cepas, fue capaz de producir biofilm en forma moderada; mientras que las 7 cepas

restantes (58,33%) fueron fuertes productoras de biofilm. En la Figura 13 se representan las medias de las absorbancias obtenidas luego del cultivo en placas de poliestireno.

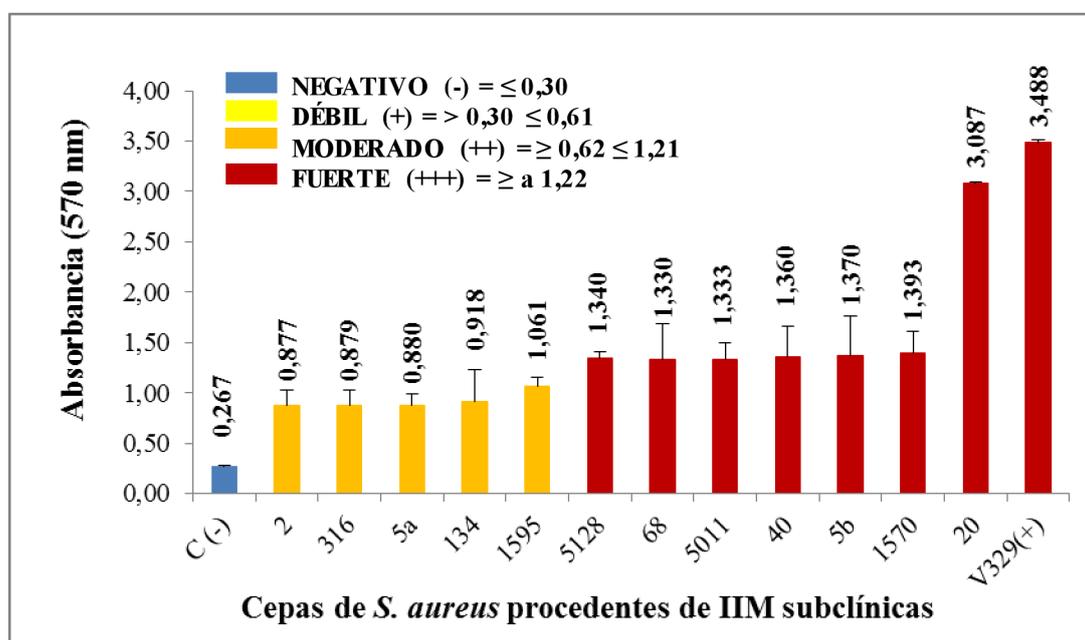


Figura 13: Representación de las medias de las absorbancias obtenidas del cultivo en placas de poliestireno de los aislados de *S. aureus* provenientes de IIM subclínicas, del control negativo (-) y del control positivo (cepa V329 de *S. aureus*).

4.2. Caracterización molecular de los aislamientos de *S. aureus*

4.2.1. Identificación genotípica de especie

El procedimiento se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento especie-específico de *S. aureus* por PCR. Se utilizó ADN genómico previamente extraído y purificado del total de los aislados. El fragmento de 108 pb resultante de la amplificación a partir del par de oligonucleótidos Sa442-1 y Sa442-2 (Tabla 3) según ha descrito Martineau y col. (1998) se evidenció en todos los casos a partir del análisis del producto de PCR en geles de agarosa (Figura 14).

A partir de este procedimiento se identificaron como *S. aureus* la totalidad (100%) de los aislados procedentes de IIM clínicas y subclínicas.

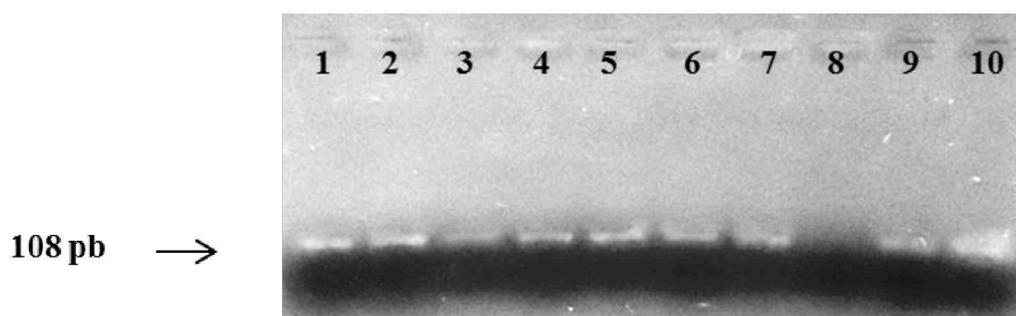


Figura 14: Imagen representativa que muestra la identificación molecular de siete aislados de *S. aureus* por amplificación de un fragmento específico de especie de 108 pb. Gel de agarosa 3%. Calle: 1 a 7- Aislados N° 8, 14, 17, 48, 1570, 1595, 5128; 8- Blanco de Reactivos; 9- *S. aureus* Reynolds (Control +); 10- *S. aureus* Becker (Control +).

4.2.2. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes.

Del total de los aislados de *S. aureus* preseleccionados, se realizó la tipificación molecular mediante PFGE a las 15 cepas provenientes de IIM clínicas (Figura 15) y a las 21 cepas provenientes de IIM subclínicas (Figura 16). Con el objetivo de analizar la relación clonal entre los aislados incluidos en cada grupo se realizó el análisis filogenético de los mismos. Para poder discernir entre tipos y subtipos se siguió el criterio establecido por Tenover y col. (1995). Posteriormente, se construyeron los dendrogramas sobre la base de los niveles de similitud y se consideró un punto de corte del 80% para definir los grupos.

La tipificación por PFGE de las 15 cepas provenientes de IIM clínicas, discriminó 8 pulsotipos o grupos, los cuales fueron designados arbitrariamente como A, B, C, D, E, F, G y H (Figura 15). El pulsotipo con mayor número de aislamientos fue el F (n=7). El siguiente pulsotipo en números de aislamientos fue el C (n=2) donde ambas cepas presentaron el mismo número de bandas y del mismo tamaño. Por lo tanto, se considera que estos aislamientos pertenecen a un mismo clon y el resto se distribuyó en grupos individuales. Las diferencias dentro del pulsotipo pueden darse como consecuencia de cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

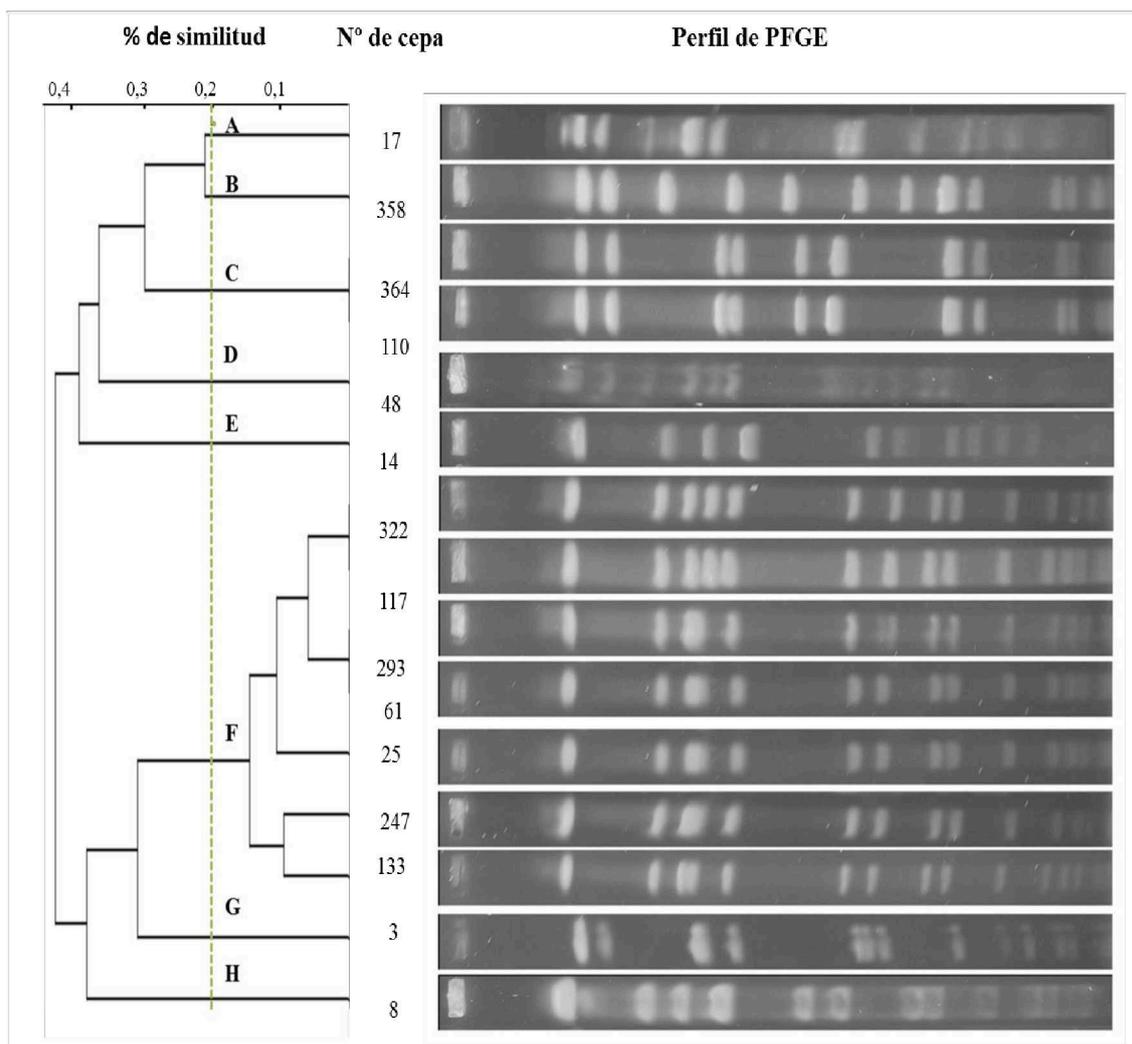


Figura 15: Dendrograma de los 15 aislamientos de *S. aureus* provenientes de IIM clínicas n°: 17, 358, 364, 110, 48, 14, 322, 117, 293, 61, 25, 247, 133, 3 y 8. La tipificación por PFGE discriminó 8 pulsotipos entre los aislamientos analizados designados con las letras A, B, C, D, E, F, G y H.

La tipificación por PFGE de las 21 cepas provenientes de IIM subclínicas discriminó 12 pulsotipos o grupos, los cuales fueron designados arbitrariamente como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y L (Figura 16). El número de cepas de cada pulsotipo fue similar. Los pulsotipos A, E, G, I y J se conformaron por cepas clonalmente idénticas (1570, 1595, 5128, 5011 y 316). Estas cepas si bien inicialmente se consideraron por separado para el análisis fenotípico y genotípico, fueron aisladas a partir de 3 muestreos sucesivos del mismo animal y del mismo cuarto mamario en un periodo de seis meses, por lo cual se las consideró como cepas altamente adaptadas a la GM bovina (crónicas). Las cepas mencionadas fueron seleccionadas para continuar con los ensayos in vitro e in vivo. Las cepas restantes (5a, 20, 2, 134, 68, 5b, 40) fueron caracterizadas en estudios

previos por PFGE (datos no publicados) como cepas crónicas a partir de tres aislamientos sucesivos del mismo animal en un periodo de 6 meses, por lo cual la relación clonal no se muestra en la Figura 16.

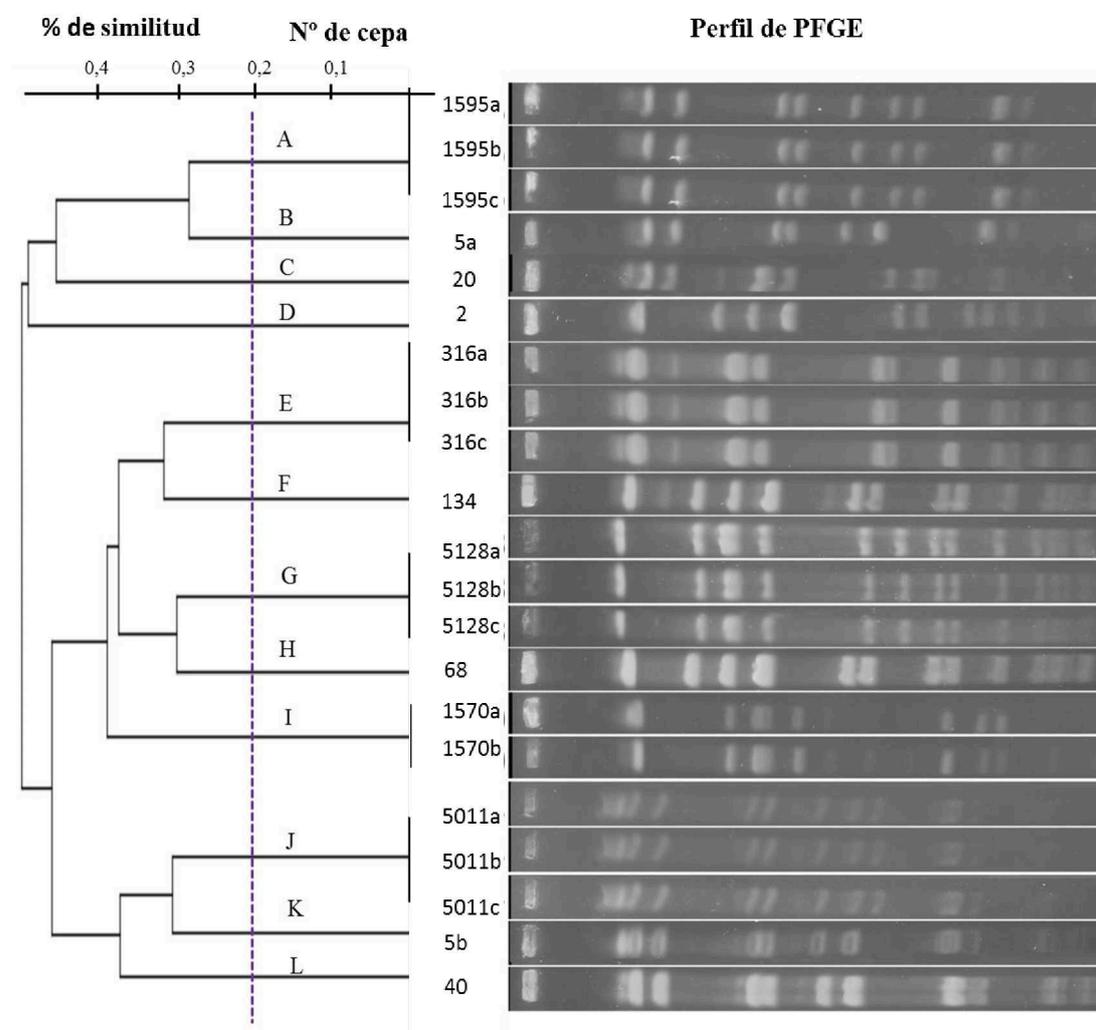


Figura 16: Dendrograma correspondiente a los 21 aislamientos de *S. aureus* provenientes de IIM subclínicas n°: 2, 5a, 20, 1570, 1595, 5b, 68, 40, 134, 5128, 316 y 5011. Las cepas 1595, 316, 5128, 1570 y 5011 fueron aisladas a partir de leche del mismo cuarto mamario en tres muestreos diferentes en un periodo de 6 meses. La tipificación por PFGE discriminó 12 pulsotipos entre los aislamientos analizados los cuales fueron designados con las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K y L.

En la Figura 17 se muestra el dendrograma de la tipificación por PFGE de las 15 cepas de *S. aureus* provenientes de IIM clínicas y de las cepas 1570, 1595, 5128, 5011 y 316 provenientes de IIM crónicas. El análisis de las relaciones clonales entre los

aislamientos discriminó 13 pulsotipos o grupos, los cuales fueron designados arbitrariamente como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L y M (Figura 17).

Del dendrograma obtenido a partir de las 20 cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas se desprende que el pulsotipo asignado con la letra F agrupó el mayor número de cepas (7) por lo tanto fue el pulsotipo más común, representando el 35% de las cepas evaluadas. Además, estuvo conformado exclusivamente por aislados procedentes de IIM clínicas.

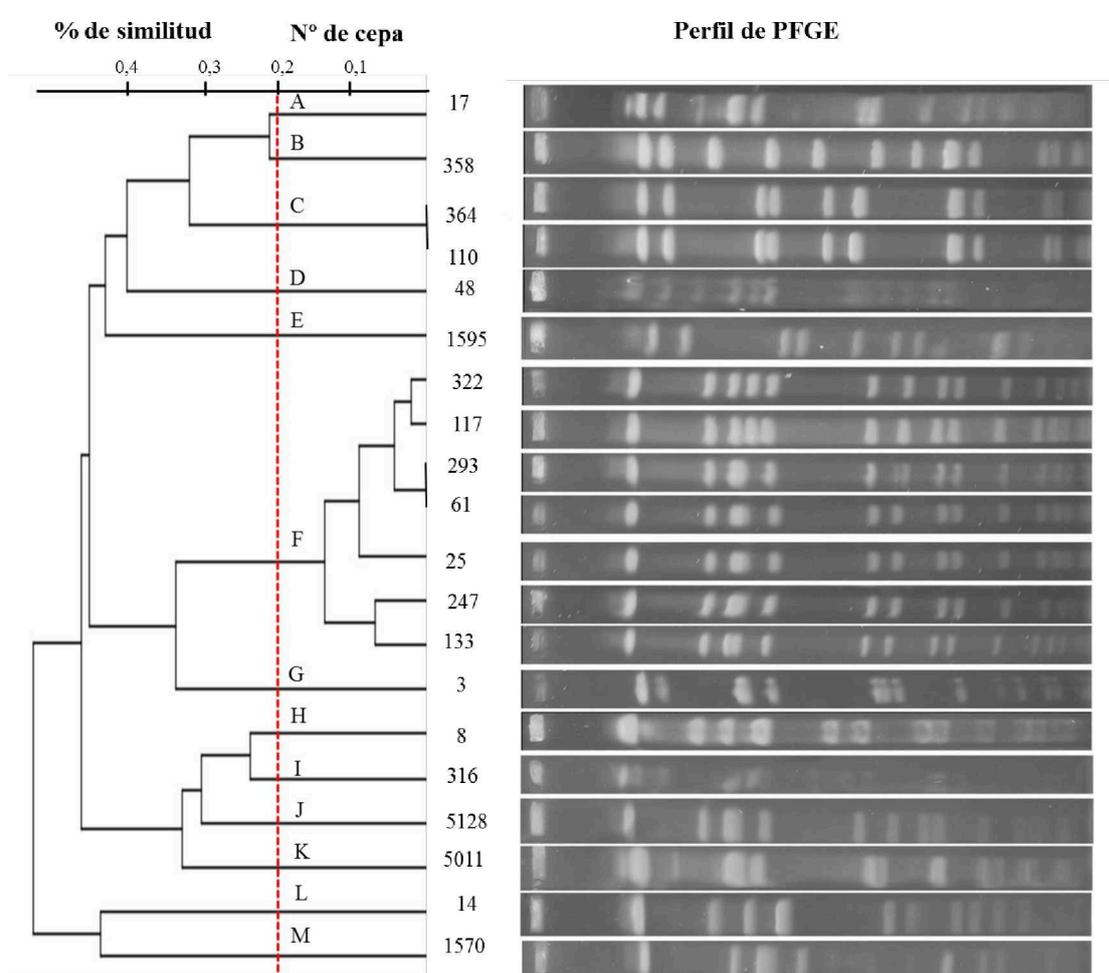


Figura 17: Dendrograma de los 20 aislamientos de *S. aureus* n°:17, 358, 364, 110, 48, 1595, 322, 117, 293, 61, 25, 247, 133, 3, 8, 316, 5128, 5011, 14, 1570. La tipificación por PFGE discriminó 13 pulsotipos entre los aislamientos analizados designados con las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L y M.

A partir del análisis filogenético se seleccionaron 5 cepas provenientes de IIM clínicas: 17 (grupo A), 358 (grupo B), 48 (grupo D), 61 y 247 (grupo F); este último grupo fue el más numeroso por ello se seleccionaron dos aislados (Figura 17) y cinco cepas provenientes de IIM crónicas pertenecientes a diferentes pulsotipos: 1595 (grupo E), 316 (grupo I), 5128 (grupo J), 5011 (grupo K) y 1570 (grupo M) (Figura 17). Se consideró un porcentaje de similitud entre las cepas seleccionadas < 20%. Este procedimiento aseguró la diversidad genética de los aislados de *S. aureus* a utilizar en los ensayos in vitro e in vivo.

4.3. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

En la Tabla 19 (A y B) se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos realizados por difusión en agar.

Tabla 19A: Resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos por pruebas de difusión en agar, realizados a cepas provenientes de IIM clínicas. Discos Oxoid: penicilina (10 UI); tetraciclina (30 µg); enrofloxacina (5 µg); trimetoprim-sulfa (1,25/23,75 µg). Disco Britania: fosfomicina (50 µg). **S:** sensible al antibiótico. **R:** resistente al antibiótico.

Nº Cepas	PENIC.	TETRA	ENROF	TMS	FOSFOM
17	R	S	S	S	S
358	S	S	S	S	S
48	S	S	S	S	S
61	R	S	S	S	S
247	R	S	S	S	S
364	S	S	S	S	S
110	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S
322	S	S	S	S	S
117	R	S	S	S	S
293	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S
133	R	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	S

Se observan 5 cepas procedentes de IIM clínicas (61, 247, 17, 133, 117) y 2 cepas procedentes de IIM crónicas (316 y 5011) resistentes a la penicilina. La producción de β -lactamasa para los aislamientos que mostraron resistencia a penicilinas de acuerdo con el método de la cefalosporina cromogénica, fue positiva para los 7 aislados.

Tabla 19B: Resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos por pruebas de difusión en agar, realizados a cepas provenientes de IIM subclínicas. Discos Oxoid: penicilina (10 UI); tetraciclina (30 μ g); enrofloxacina (5 μ g); trimetoprim-sulfa (1,25/23,75 μ g). Disco Britania: fosfomicina (50 μ g). **S:** sensible al antibiótico. **R:** resistente al antibiótico.

Nº Cepas	PENIC.	TETRA	ENROF	TMS	FOSFOM
1595	S	S	S	S	S
316	R	S	S	S	S
5128	S	S	S	S	S
5011	R	S	S	S	S
1570	S	S	S	S	S
5a	S	S	S	S	S
5b	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S
134	S	S	S	S	S
68	S	S	S	S	S
40	S	S	S	S	S

4.4. Evaluación de la presencia de genes relacionados con adherencia, formación de biofilm, polisacáridos capsulares y resistencia a penicilina en el genoma de *S. aureus*

Mediante reacciones de PCR se evaluó la presencia de los genes relacionados con adherencia, formación de biofilm, cápsula y resistencia a penicilina en el genoma de *S. aureus* en los aislados procedentes de IIM clínicas y subclínicas. Para la amplificación de los fragmentos de genes de interés se utilizaron los pares de oligonucleótidos correspondientes (Tabla 10) junto a demás reactivos y condiciones de amplificación previamente descritas. La presencia de los genes se confirmó mediante corrida electroforética de los productos de amplificación en geles de agarosa al porcentaje adecuado según la longitud del fragmento a visualizar. En la Tabla 20 se detalla la presencia o ausencia de los genes estudiados.

Tabla 20: Análisis de la presencia (+) o ausencia (-) de genes de adherencia, formación de biofilm, cápsula y del gen de resistencia a los β -lactámicos en aislados de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas. Resultados de la amplificación de los fragmentos de interés por PCR y oligonucleótidos específicos.

Aislado	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaC</i>	<i>bap</i>	<i>cna</i>	<i>fib</i>	<i>cap</i>	<i>blaZ</i>
17	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>cap8</i>	+
358	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>cap8</i>	-
48	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>cap5</i>	-
61	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	+
247	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	+
364	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	<i>cap8</i>	-
110	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap8</i>	-
14	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>NT</i>	-
322	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>NT</i>	-
117	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	+
293	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>NT</i>	-
25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
133	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	+
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>cap8</i>	-
8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
1595	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap8</i>	-
316	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap8</i>	+
5128	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
5011	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>NT</i>	+
1570	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	<i>cap8</i>	-
5a	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
5b	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
20	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	<i>cap5</i>	-
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
134	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
68	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
40	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	<i>cap5</i>	-
% de prevalencia	92,55	100	96,30	97,50	96,30	100	96,30	0	18,51	97,5	85,18	25,92

Referencias: *clfA* (clumping factor A), *clfB* (clumping factor B), *fnbA* (fibronectin binding protein A), *fnbB* (Fibronectin binding protein B), *icaA* (Intercellular adhesion A), *icaD* (Intercellular adhesion D), *icaC* (Intercellular adhesion C), *bap* (Biofilm-associated protein), *cna* (Collagen-binding Adhesin), *fib* (Fibrinogen binding protein), *cap* (polisacárido capsular), *blaZ* (resistencia a la penicilina).

Sólo dos genes relacionados con adherencia de *S. aureus* a células del hospedador y formación de biofilm pudieron detectarse en todos los aislados, con un 100% de prevalencia, estos fueron *clfB* e *icaD*; en segundo orden se encontraron los genes *fnbB* y *fib* con un 97,5%; *fnbA*, *icaA* e *icaC* se detectaron en un 96,30%; *clfA* se detectó con un

92,55%. Los genes cap5 y cap8 se detectaron en el 85,18% de las cepas evaluadas, correspondiendo 55,55% a cap5, 29,6% a cap8 y 14,81% fueron cepas que no amplificaron cap5 ni cap8 y se definieron como no tipificables (NT). El 46,66% de las cepas procedentes de IIM clínicas presentó el gen cap5, mientras que el 33,33% presentó el gen cap8 y el resto no expresaron ninguno de los genes cap (20%). Con respecto a las cepas procedentes de IIM subclínicas, el 66,66% presentó el gen cap5, el 25% presentó el gen cap8, y el resto de las cepas no expresaron ninguno de los genes cap (8,33%). En muy escasas muestras, 18,51% y 25,92% se detectaron los genes cna y blaZ, respectivamente. En ninguno de los aislados estudiados se pudo detectar el gen que codifica para la proteína asociada a biofilm (bap).

4.5. Ensayos de internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T)

Los ensayos de internalización in vitro en MAC-T se realizaron con cepas seleccionadas en base a parámetros clínicos, fenotípicos, epidemiológicos y susceptibilidad a antibióticos. Además, para asegurar la diversidad genética en los ensayos de internalización, se tuvieron en cuenta los resultados de los PFGE, incluyendo cepas de diferentes clones. También se consideró que las cepas seleccionadas portaran genes relacionados con adherencia/invasión y formación de biofilm. Asimismo, se incluyeron cepas portadoras de genes de resistencia a penicilina, genes capsulares y una cepa NT.

En base a los criterios mencionados fueron seleccionados los aislados N°: 247, 61, 358, 48 y 17 (procedentes de IIM clínicas) y los aislados 1570, 316, 5011, 1595 y 5128 (procedentes de IIM crónicas o de alta adaptación a la GM bovina). Por otra parte se incluyó como control de invasión, la cepa de *E. coli* DH5- α que no invade CEM. En la Tabla 3 del Anexo II se resumen las características generales de las cepas utilizadas para los ensayos de invasión de acuerdo a los criterios de selección mencionados.

Los porcentajes de internalización de cada aislado se obtuvieron a partir del cocultivo de las bacterias con las MAC-T, como se describió anteriormente en la sección Materiales y Métodos. En la Figura 18 se presentan los porcentajes de internalización obtenidos para cada cepa de *S. aureus* evaluada. Los valores corresponden a la media \pm el desvío estándar (DE) de los ensayos realizados por triplicado.

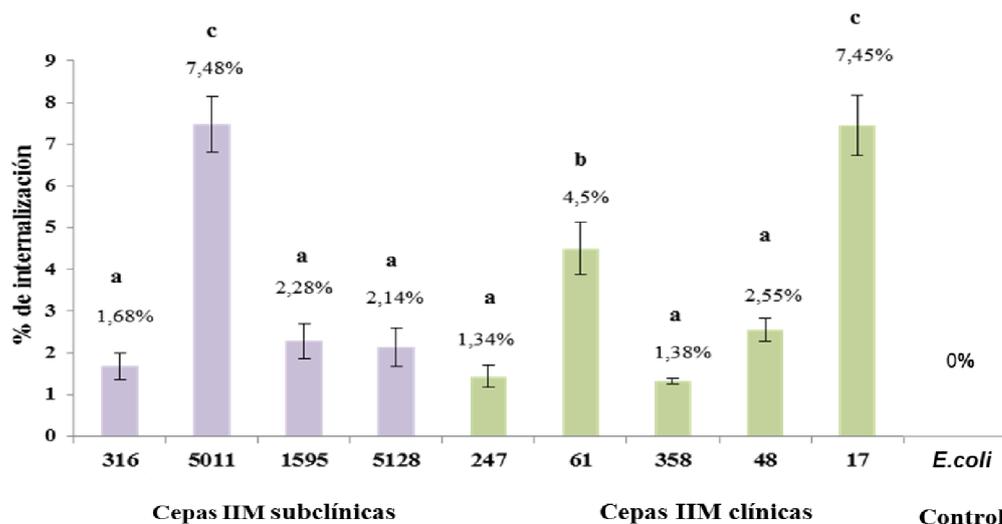


Figura 18: Valores de porcentajes de internalización celular correspondientes a los 9 aislados de *S. aureus* seleccionados. Los valores corresponden a la media \pm el desvío estándar (DE) de los ensayos realizados por triplicado. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Resultados obtenidos a partir del co-cultivo de bacterias y células MAC-T durante 2 horas ($MOI = 100$ bacterias/célula). Como control de invasión se utilizó la cepa no invasiva *E. coli* DH5- α .

Los resultados de los ensayos mostraron una gran variabilidad en cuanto a los porcentajes de internalización obtenidos para las diferentes cepas. En base al valor medio y teniendo en cuenta la amplitud de las barras de error asociadas a la dispersión de los resultados, estos aislados pudieron agruparse en tres conjuntos. El primer conjunto integrado por dos cepas que presentaron valores de internalización mayores al resto ($P < 0,05$) representados por una cepa aislada de IIM clínica ($7,45 \pm 0,72\%$) y la otra de IIM subclínica (crónica) ($7,48 \pm 0,67\%$). Otra cepa aislada de IIM clínica mostró porcentajes de internalización intermedios difiriendo significativamente ($P < 0,05$) con las demás cepas evaluados ($4,50 \pm 0,62\%$). En un tercer conjunto se agruparon las cepas que presentaron porcentajes de internalización menores al resto ($P < 0,05$), de las cuales 3 cepas provenían de IIM subclínicas (crónicas) y 3 de IIM clínicas, presentando porcentajes comprendidos entre $1,34 \pm 0,07\%$ y $2,55 \pm 0,27\%$.

Los resultados presentados muestran que los porcentajes de internalización no se asociaron con la manifestación clínica de la IIM, mostrando tanto las cepas procedentes de IIM clínicas como subclínicas (crónicas) capacidades invasivas diferentes. A partir del gráfico de barras se puede visualizar que las cepas procedentes de IIM subclínicas o

persistentes, mostraron una capacidad invasiva media aunque muy similar entre sí a excepción de la cepa 5011, que mostró ser la más invasiva de este grupo. Por otra parte, los aislados de IIM clínicas mostraron capacidades invasivas con diferencias significativas entre ellas.

Cabe mencionar que los porcentajes de internalización obtenidos a partir de los ensayos de invasión realizados con la cepa 1570 no fueron incluidos en la Figura 18 debido a la baja repetibilidad de los resultados obtenidos.

La Figura 19 muestra las medias del \log_{10} UFC/ml obtenidas luego de 2 horas de incubación de las 9 cepas de *S. aureus* en el medio de cultivo de las MAC-T. De la misma se desprende que las cepas procedentes de infecciones IIM clínicas presentaron una mayor velocidad de crecimiento ($P=0,015$) que las cepas procedentes de IIM crónicas, mostrando mayor capacidad para multiplicarse en un microambiente propicio para el crecimiento de las de las CEM bovinas.

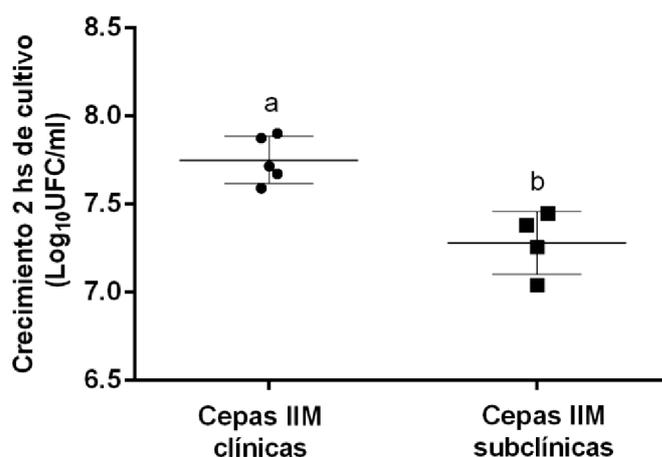


Figura 19: Medias del \log_{10} UFC/ml obtenidas luego de 2 horas de incubación de las cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas. La comparación de medianas por el test de Mann Whitney arrojó diferencias estadísticamente significativas entre cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas ($p=0,015$).

4.6. Evaluación y selección del gen estándar interno para PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR).

Con el fin de realizar el estudio de la expresión relativa de los principales genes involucrados en adherencia e invasión a células MAC-T, se evaluaron tres genes como

estándar interno. En principio se evaluó un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S bacteriano. Para tal fin se amplificó dicha secuencia a partir del par de cebadores descritos por Ster y col. (2005) observándose bandas de amplificación del tamaño correspondiente a esa secuencia tanto en las calles correspondientes a las muestras de los aislados como en la correspondiente al blanco de reactivos (Figura 20). Sucesivas PCR realizadas, permitieron descartar cualquier contaminación externa con productos de amplificaciones anteriores. Las posibles causas se evalúan en el apartado de Discusión de resultados.

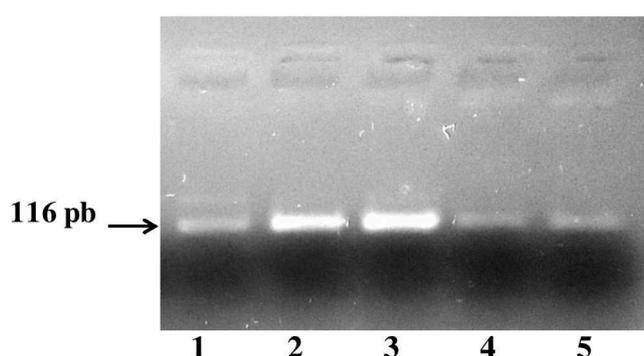


Figura 20: Amplificación del fragmento codificante para ARNr 16S procariota (116 pb). Gel de agarosa 3%. Calles: 1 a 3- ADNc de Aislados 25, 117, 358; 4- Control de amplificación de ADN genómico, muestra de ADNc de glándula mamaria bovina; 5- Blanco de reactivos.

Posteriormente, se probaron otros dos pares de oligonucleótidos que amplifican fragmentos específicos de *S. aureus*. Uno de ellos amplifica un fragmento del gen que codifica para la subunidad B de la enzima ADN girasa (*gyrB*) (Tabla 14), responsable de la relajación de la doble hebra de ADN durante el proceso de replicación. El segundo par descrito por Martineau y col. (1998) fue analizado mediante el software Primer Blast encontrándose que amplifica una porción de la secuencia del gen que codifica para una proteína de la familia de las glutamina sintetasas (*GS*) (Schenning y col., 1993) (Tabla 3) la cual cumple un rol esencial en el metabolismo del nitrógeno, catalizando la condensación -dependiente de ATP- de glutamato y amoníaco para formar glutamina.

Para el análisis de estabilidad de expresión, en primer lugar se amplificaron ambos fragmentos por duplicado mediante RT-qPCR. Como muestras se utilizó el ADNc de todos los aislados provenientes de muestras control y tratadas (bacterias internalizadas y no internalizadas previamente co-cultivadas con células MAC-T). Los valores de C_T promedio obtenidos de las réplicas se introdujeron en el software BestKeeper. Se

dejaron de lado los datos de los aislados 61 y 5128 por presentar un comportamiento particular diferente al del resto. Este software realizó el tratamiento estadístico de los datos arrojando parámetros como CV y DE, que representan la dispersión en los resultados. Dichos parámetros fueron utilizados para seleccionar aquel gen que presentó menor variabilidad entre las cepas como también entre los tratamientos.

A pesar de que ambos genes obtuvieron valores de DE mayores a 1, el cual el programa establece como máximo aceptable, en el caso de *gyrB* $S = 1,02$, resultó un valor muy cercano al establecido como límite. Sin embargo, el gen *GS* presentó un valor de 1,25. Adicionalmente, en ambos casos se pudieron observar CV de 4,17 y 5,13% para los genes *gyrB* y *GS*, respectivamente. Estos valores resultaron inferiores a 7-10%, rango límite para considerar homogéneo el conjunto de datos ingresados.

Si bien el comportamiento resultó bastante similar, el gen *gyrB* presentó menor variabilidad entre las diferentes cepas y condiciones experimentales analizadas. Por este motivo se estableció dicho gen como housekeeping para la normalización de los resultados de expresión relativa de los genes de adherencia e invasión.

4.6.1. Cálculo de la eficiencia (E) de amplificación del gen housekeeping y genes target.

Con el objeto de realizar el cálculo de R para los genes de interés, en primer lugar se debió obtener el valor de la eficiencia de amplificación de cada par de oligonucleótidos, ya que la misma puede diferir del valor ideal (100%) afectando los resultados de expresión relativa calculados. Para cada conjunto de cebadores se construyó la gráfica de los valores de C_T en relación a la concentración de ADNc correspondiente a un pool de ADNc de los aislados. Los puntos de dicha gráfica correspondieron a la reacción de amplificación de 7 diluciones seriadas (1:5) de la muestra. La cantidad de ADNc se expresó como $\log_{10} [\text{ADNc}]$ para obtener así un conjunto de puntos que se ajustan a una regresión del tipo lineal. De este modo, a partir de la recta obtenida es que se tomó el parámetro correspondiente a la pendiente de la misma para calcular E a partir de la fórmula descrita por Rasmussen (2001).

A continuación, en la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al valor de la pendiente y la eficiencia de amplificación (E) para cada par de cebadores.

Tabla 21: Valor de la pendiente correspondiente a la regresión lineal de la gráfica C_T vs \log_{10} [ADNc] para cada par de oligonucleótidos. La eficiencia (E) se calculó a partir de estos valores aplicando la fórmula descrita por Rasmussen (2001).

Primers Valor	CifA	CifB	FnbA	FnbB	IcaA	IcaD	GyrB
Pendiente	-3,217	-3,483	-3,185	-3,197	-3,323	-3,386	-3,284
E	1	0,9369	1	1	0,9995	0,9739	1

4.7. Determinación de la expresión relativa (R) de genes de adherencia y formación de biofilm a partir de cepas de *S. aureus* en el modelo de invasión in vitro

Mediante RT-qPCR se amplificaron por duplicado los fragmentos correspondientes a los genes de adherencia y formación de biofilm para cada uno de los aislados pre-seleccionados. Los datos de C_T y E para cada cepa y condición ensayadas se introdujeron en la plataforma del software REST 2009 V2.0.13 para obtener los resultados de R y de significancia estadística.

Los resultados del ensayo se muestran a continuación en la Tabla 22, mientras que el análisis completo se encuentra en **Anexo III**.

Los valores correspondientes a las casillas en celeste no mostraron diferencia significativa ($P > 0,05$) en la expresión respecto a la muestra control. Los valores correspondientes a las casillas en verde fueron significativamente inferiores ($P < 0,05$) y los de las casillas color violeta tuvieron una sobreexpresión significativa respecto al control ($P < 0,05$). Cabe aclarar que no se pudo llevar a cabo el análisis de expresión génica de las muestras 61 y 5128 no internalizadas ya que en las mismas se observó una variación significativa de la expresión del housekeeping respecto al control en esa condición experimental en particular, lo que no permitió una correcta normalización. Por esa razón no se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Valores de R obtenidos a partir del tratamiento de C_T para cada cepa en condiciones experimentales de co-cultivo con MAC-T frente al correspondiente control. Referencias:

□ Sin diferencia respecto al control ↓ Expresión disminuida ↑ Expresión aumentada

	Cepas	CifA	CifB	FnbA	FnbB	IcaA	IcaD
No Internalizadas	247	0,583	0,717	0,444	1,016	0,236	0,403
	358	0,997	0,930	0,963	0,618	1,206	1,523 ↑
	48	0,627 ↓	1,105	0,462 ↓	4,815 ↑	0,976	0,661 ↓
	17	0,081 ↓	0,086 ↓	0,753 ↓	5,746 ↑	0,350 ↓	0,235
	1595	0,327	0,646	0,708	0,342 ↓	0,343 ↓	0,138 ↓
	316	0,105 ↓	0,073 ↓	0,072 ↓	0,026 ↓	1,167	1,302
	5011	4,976	3,934 ↑	0,072 ↓	0,021 ↓	0,191 ↓	5,293 ↑
Internalizadas	247	1,075	0,818	53,446 ↑	29, 243 ↑	2,136	6,678 ↑
	61	2,021	0,945	97,006 ↑	23,425 ↑	0,829	3,296 ↑
	358	57,88 ↑	4,918 ↑	97,006 ↑	23,507 ↑	11,080 ↑	88,982 ↑
	48	2,662 ↑	3,730 ↑	42,921 ↑	37,987 ↑	5,374 ↑	18,059 ↑
	17	3,537 ↑	1,828	2,848 ↑	406,61 ↑	5,903 ↑	17,352 ↑
	1595	21,706 ↑	1,313	56,298 ↑	17,753 ↑	1,814	4,236 ↑
	5128	1,094	1,166	5,426 ↑	1,064	1,205	2,821 ↑
	316	2,454 ↑	16,718 ↑	18,700 ↑	11,043 ↑	13,215 ↑	28,457 ↑
5011	81,572 ↑	30,890 ↑	71,755 ↑	157,586 ↑	5,774 ↑	192,661 ↑	

En líneas generales se destaca el comportamiento de las bacterias que lograron internalizarse en las células MAC-T. En este grupo, la expresión de genes relacionados con adherencia y formación de biofilm fue significativamente superior a la observada en bacterias que no lograron la invasión (CifA, $P=0,005$; CifB, $P=0,016$; FnbA, $P<0,001$; FnbB, $P<0,001$; IcaA, $P=0,002$ e IcaD, $P=0,001$). En el grupo de bacterias que lograron la invasión a la MAC-T, se sobre-expresaron la mayoría de los genes de adherencia e

invasión con valores de expresión relativa muy elevados. No obstante, solo cuatro aislados sobre-expresaron todos los genes evaluados, estos fueron 48 y 358 (procedentes de IIM clínicas) y 316 y 5011 (procedentes de IIM crónicas). Los genes con valores de R más elevados fueron los codificantes de proteínas de unión a Fn e icaD, aunque en este último caso, con valores R variables. Puntualmente, resultó sobresaliente el valor R de FnBP-B en el aislado 17 alcanzando una expresión 406,61 superior a la de la muestra control.

En el grupo de bacterias procedentes de IIM clínicas y subclínicas que lograron la invasión a la MAC-T no se observaron diferencias significativas en la expresión de ClfA (P=0,714), ClfB (P=0,412), FnbA (P=0,666), FnbB (P=0,190), IcaA (P=0,893) e IcaD (P=0,513) entre las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas.

En el caso de las bacterias que no lograron internalizarse en células MAC-T la expresión relativa de los genes de adherencia se mantuvo sin variaciones respecto al control para la mayoría de los casos. Sin embargo, algunos aislados mostraron una expresión disminuida en simultáneo con varios genes de adherencia en relación al grupo control. Aquellos aislados que mostraron este comportamiento fueron 48, 17, 1595, 316 y 5011. Adicionalmente, en tres de los genes ensayados (ClfB, fnbB e icaD), se advirtió una conducta diferencial e inusual (teniendo en cuenta el comportamiento general). La expresión relativa de ClfB en el aislado 5011; fnbB en los aislados 48 y 17; y de icaD en los aislados 358 y 5011 se vieron incrementadas respecto al grupo control, aunque con valores bajos de R: 3,934; 4,815; 5,746; 1,523 y 5,293 respectivamente.

En el grupo de bacterias que no lograron invadir la célula epitelial mamaria, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ClfA (P=0,402), ClfB (P=0,742), FnbA (P=0,200), FnbB (P=0,057), IcaA (P=0,571) e IcaD (P=0,857) entre las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas.

A partir de estos resultados se puede inferir que, tanto en las bacterias que lograron invadir las MAC-T como en las que no lo lograron, la expresión de los genes relacionados con adherencia y formación de biofilm estuvo principalmente ligada a cada aislado de *S. aureus* y no a las características de la IIM (clínica o subclínica).

4.8. Curvas de crecimiento de *S. aureus*

Con el objeto de evaluar la posible asociación entre invasión de células MAC-T, expresión de genes de adherencia y formación de biofilm y capacidad de multiplicación bacteriana, se construyeron las curvas de crecimiento de los aislados de *S. aureus* provenientes de IIM clínicas y subclínicas mediante cultivos en placa de suspensiones bacterianas crecidas a lo largo de un periodo de 8 horas, como se detalló previamente.

Se construyeron las curvas de crecimiento de los aislados de *S. aureus* mediante cultivos en placa de suspensiones bacterianas crecidas durante diferentes periodos de tiempo como se detalló previamente en la sección Materiales y Métodos.

La forma de las gráficas permitieron analizar el comportamiento de cada aislado durante el crecimiento en cultivo. Una de las principales diferencias encontradas correspondió a la existencia y duración de la fase lag. Mientras que el aislado N° 48 presentó una fase lag de aproximadamente 2 horas, en el caso del aislado 358 ésta no alcanzó 1 hora de duración, y en el resto de los aislados se encontró ausente.

Por otra parte, si bien no se pudieron medir los puntos finales de las curvas correspondientes a N° 48 y 316, por lo que no se logró definir el comienzo de la fase estacionaria; en el resto de los casos se pudo observar una densidad celular máxima semejante alcanzada alrededor de las 5 hs de cultivo, correspondiente a un valor promedio de log UFC/ml igual 9 (10^9 UFC/ml).

Es de importancia mencionar que la cepa N° 61 presentó dificultades en el crecimiento, inclusive al repetirse el ensayo, por lo que no se logró construir la curva correspondiente. Las curvas de crecimiento obtenidos para el resto de los aislados se exhiben en la Figura 21.

Luego de obtenidas las curvas de crecimiento, se tomaron de cada una los valores de tiempo y \log_{10} UFC/ml correspondientes a la fase de crecimiento exponencial, para realizar el ajuste matemático que permitió calcular el TD bacteriano para cada aislado en particular.

A partir del valor de la pendiente, obtenida directamente del registro de parámetros de la regresión lineal aplicada, se calcularon los tiempos de duplicación según la fórmula (D) detallada en sección Materiales y Métodos (3.7.). Teniendo en cuenta que el tiempo calculado corresponde al cambio en una unidad logarítmica y que a su vez, ésta corresponde a 4,125 duplicaciones bacterianas, es que se recalculó el tiempo de generación real. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 23.

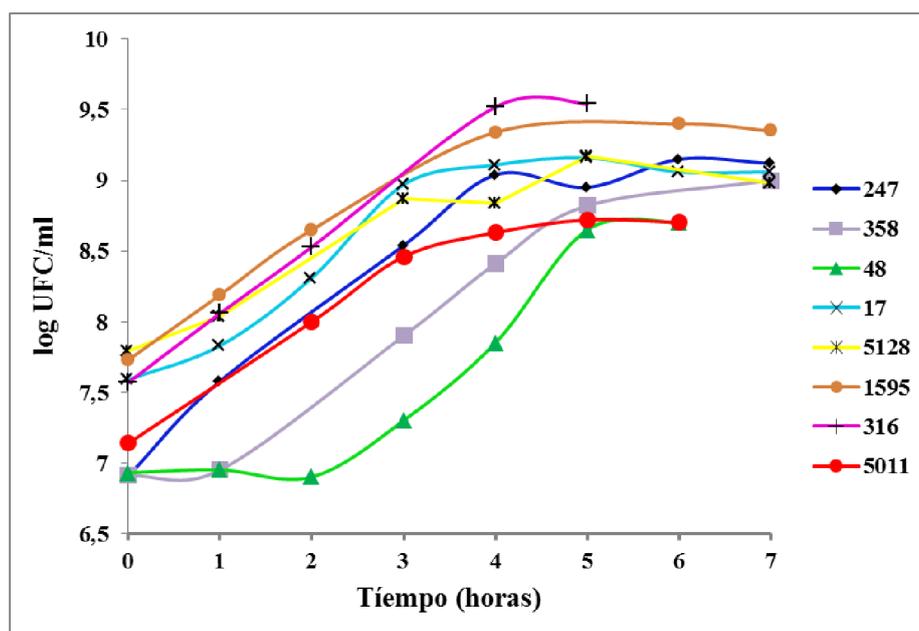


Figura 21: Curvas de crecimiento de aislados de *S. aureus* en cultivos individuales crecidos en agitación (150 rpm) a 37°C. Los puntos corresponden al recuento en placa de muestras tomadas cada 1 hora durante 8 horas.

Los resultados obtenidos permitieron clasificar a los aislados en dos grupos, uno con TD entre 31 y 39 minutos, y otro con TD que variaron entre los 40 y 46 min. Todas las cepas del primer grupo pertenecían a mastitis clínicas, mientras que las del segundo grupo pertenecían a mastitis subclínicas. La Figura 22 muestra que los TD de las cepas procedentes de IIM clínicas fueron menores a los observados en las cepas procedentes de IIM subclínicas hallándose diferencias significativas ($P=0,028$).

Tabla 23: Valores de tiempo de duplicación en minutos (') y segundos (") para los aislados de *S. aureus*.

Cepas	247	358	17	48	1595	5128	316	5011
1/pendiente (hs)	1,916	2,119	1,754	1,724	2,495	2,718	2,188	2,282
Tiempo de duplicación	35' 22"	39' 7"	32' 23"	31' 50"	46' 4"	50' 11"	40' 24"	42' 08"
Tiempos en segundos	2122"	2347"	1943"	1910"	2764"	3011"	2424"	2528"

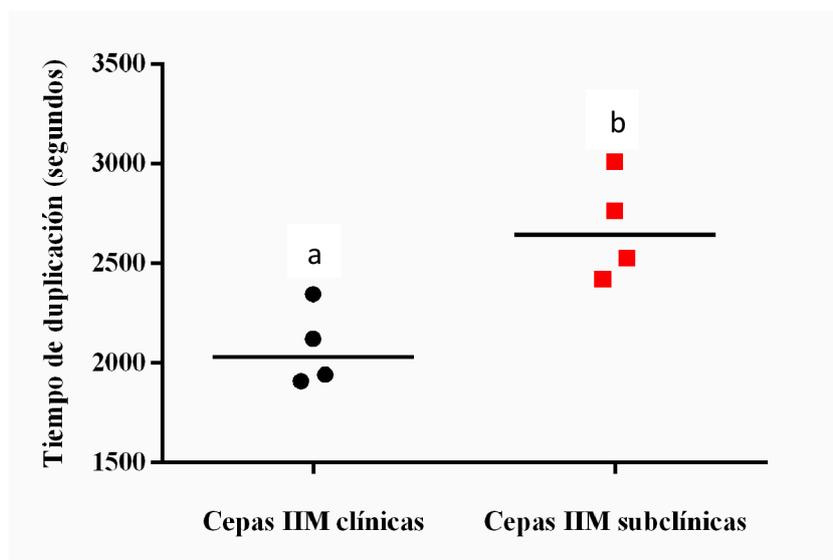


Figura 22: Tiempos de duplicación (TD) promedios de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas en segundos (**). La comparación de medianas por el test de Mann Whitney arrojó diferencias estadísticamente significativas entre cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas ($p=0,0286$). Diferentes letras indican diferencias significativas.

4.9. Diseño experimental de un modelo murino de infección intramamaria con *S. aureus*.

4.9.1. Puesta a punto del modelo y selección de la dosis de bacterias a inocular en la glándula mamaria de ratón.

A los fines de poner a punto el modelo de IIM en el ratón, en una primera instancia se procedió a enhebrar el conducto del pezón con una aguja 30G X 1/2 y a inyectar 50 μ l de una solución de azul de metileno a los fines de poder visualizar macroscópicamente la distribución correcta del colorante en el sistema de conductos de las glándulas mamarias abdominales derechas (R4) e izquierdas (L4) (Figura 23 a). Luego de la inoculación IM, se procedió al sacrificio de los animales y posterior disección y remoción de las GM abdominales L4 y R4. Las secciones de tejido extraídas fueron inmediatamente fijadas en formol-bufferado (4%) para la caracterización histológica (Figura 23 b y c).

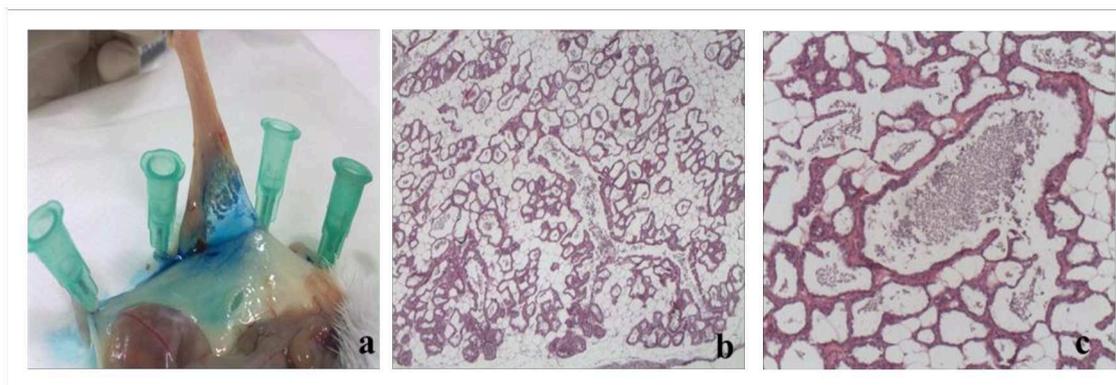


Figura 23: Puesta a punto del modelo de IIM en ratón. a) Disección de la glándula mamaria abdominal de ratón inoculada por vía intramamaria con una solución de azul de metileno. b) Corte histológico de la glándula mamaria de ratón luego de la inoculación del colorante (4X) y c) 10X. Coloración hematoxilina-eosina.

Una vez comprobado que la solución colorante inoculada se dispersó por todo el sistema de conductos mamarios y a los efectos de seleccionar la cantidad de UFC de las cepas de *S. aureus* a inocular, se realizó un ensayo dosis-respuesta. En el mismo, se testaron 3 suspensiones bacterianas diferentes de la cepa A y B de *S. aureus* (1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 UFC/glándula). Los animales fueron sacrificados a los 4 días post inoculación (pi) y se recolectaron las GM para análisis histológico y recuento de UFC/glándula. Para la selección de la dosis final se consideró la respuesta inflamatoria local, evaluando la misma en términos de infiltrado celular inflamatorio de polimorfonucleares (PMN) en el tejido afectado y la recuperación bacteriana a través del recuento de UFC/glándula.

Luego de la inoculación IM de las diferentes suspensiones bacterianas de *S. aureus* no se observaron cambios macroscópicos en las GM ni tampoco modificaciones en el comportamiento de los animales. Microscópicamente, la dosis de 1×10^6 UFC/glándula fue la que indujo mayor cantidad de infiltrado celular inflamatorio de PMN para las dos cepas inoculadas, y las bacterias pudieron ser recuperadas de la GM hasta el día 4 pi; por estas características fue seleccionada como la dosis de inoculación.

4.9.2. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para evaluar la persistencia in vivo de las cepas A (17) y B (5128) de *S. aureus* seleccionadas, luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula, se obtuvieron los valores promedios de log UFC/glándulas disgregadas desde las 6 hs hasta las 264 hs (11

días) pi. Los valores promedios de log UFC/glándula, obtenidos a diferentes tiempos pi, se muestran en la Figura 24.

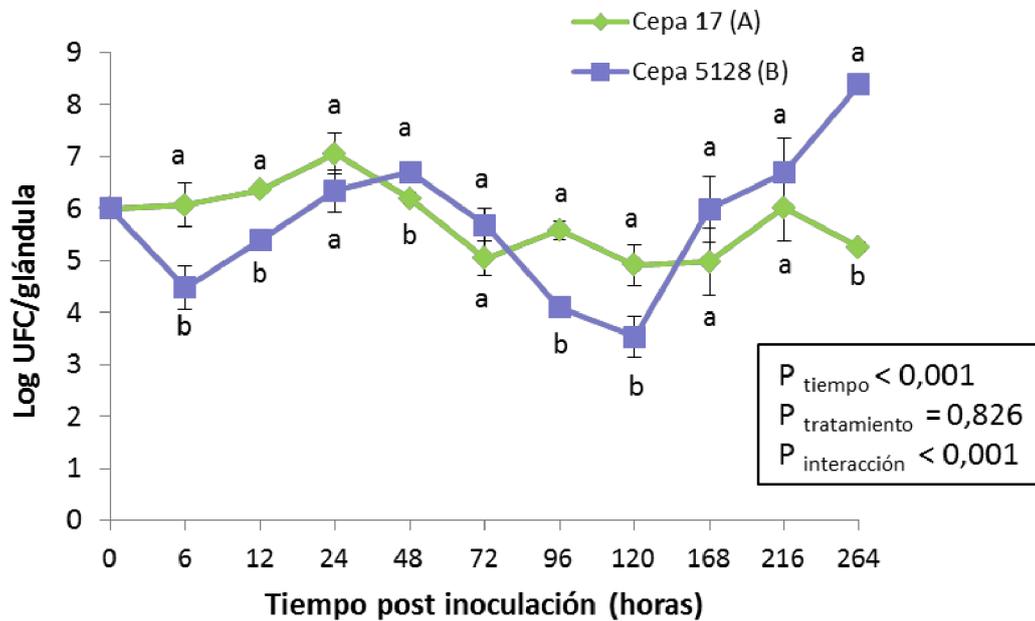


Figura 24: Persistencia de las cepas A y B en la glándula mamaria murina. Medias \pm error estándar de la media del log UFC/glándula obtenidas a partir del homogenizado de las glándulas mamarias luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de la cepa A y B de *S. aureus* a las 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216 y 264 horas post inoculación. Se muestran los efectos principales del tiempo de muestreo y del tratamiento con las cepas A y B y el efecto de la interacción entre ambos factores. En cada tiempo post inoculación diferentes letras entre las cepas A y B indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Se evaluaron los efectos individuales del tiempo de muestreo y de los tratamientos con las cepas A y B de *S. aureus*, así como de la interacción entre ambos factores sobre el número de UFC/glándula obtenidas luego de la inoculación IM. Los resultados mostraron un efecto significativo del tiempo de muestreo ($P < 0,001$) y de la interacción de ambos factores ($P < 0,001$); en cambio, el efecto de la cepa infectante sobre el número de bacterias obtenidas a partir del homogeneizado de las GM no fue significativo ($P = 0,826$).

A las 6 y 12 hs pi el número de UFC/glándula se incrementó notablemente para ambas cepas evaluadas, siendo mayor el número de bacterias obtenidas para la cepa A con respecto a la cepa B en ambos periodos evaluados (6 hs, $P = 0,024$; 12 hs, $P = 0,030$). A las 24 hs pi, si bien el número de UFC/glándula para la cepa A fue el máximo

alcanzado, no se observaron diferencias estadísticas con respecto al número de bacterias obtenidas para la cepa B ($P=0,126$). A las 48 hs pi, si bien el número de UFC/glándula para la cepa B continuó en aumento, el número de bacterias obtenidas para la cepa A disminuyó notablemente con respecto al de la cepa B ($P=0,010$). A las 72 hs pi el número de UFC obtenidas del homogenizado de las GM disminuyó para ambas cepas evaluadas, no observándose diferencias entre ellas ($P=0,220$). A las 96 y 120 hs pi el número de UFC obtenidas de las GM para la cepa B disminuyó notablemente en relación al de la cepa A (96 hs, $P=0,015$; 120 hs, $P=0,046$). A las 168 hs pi (7 días) el número de UFC/glándula para la cepa B aumentó en relación al periodo anterior alcanzando valores similares a los de la cepa A ($P=0,222$). Si bien la tasa de eliminación bacteriana fue similar entre ambas cepas a las 168 hs pi y 216 hs pi ($P=0,361$), a las 264 hs pi (día 11) se observó un aumento significativo en el número de UFC/glándula en el grupo de ratones tratados con la cepa B con respecto al grupo tratado con la cepa A ($P<0,0001$). Si bien ambas cepas lograron persistir hasta el día 11 luego de la IIM, las GM inoculadas con la cepa A lograron una eliminación más eficiente de las bacterias a lo largo del tiempo de muestreo, no así las GM inoculadas con la cepa B, que no lograron eliminar a las bacterias lo que se traduce en el notable incremento de las UFC/ml observado a partir del día 9 y hasta el día 11 pi.

No se obtuvieron bacterias de las GM de ratones controles, inoculados con solución fisiológica estéril, en ninguno de los tiempos evaluados.

4.9.3. Evaluación del daño tisular y reacción inflamatoria

Los diferentes grupos de ratones fueron sacrificados y se realizaron las necropsias a distintos tiempos pi luego de la infección IM con las cepas A y B de *S. aureus*. Se evaluaron las lesiones macroscópicas y posteriormente las GM fueron diseccionadas y parte del tejido fue fijado y conservado en formol-bufferado (4%) con el fin de efectuar estudios histopatológicos. Los tejidos fueron procesados, cortados y coloreados con la técnica de hematoxilina-eosina para su visualización al microscopio óptico.

En la Figura 25 se muestran las lesiones macro y microscópicas a las 6 hs luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

En las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 25a). A la observación microscópica y en zonas definidas del parénquima mamario, se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes con conservación de la estructura epitelial. En el tejido conjuntivo perivascular se observó infiltrado de neutrófilos y macrófagos así como también en el tejido conjuntivo que rodea a conductos y alvéolos (Figuras 25c, d). En contraste con las lesiones descritas, también se observaron zonas del parénquima mamario con la estructura conservada sin lesiones aparentes.

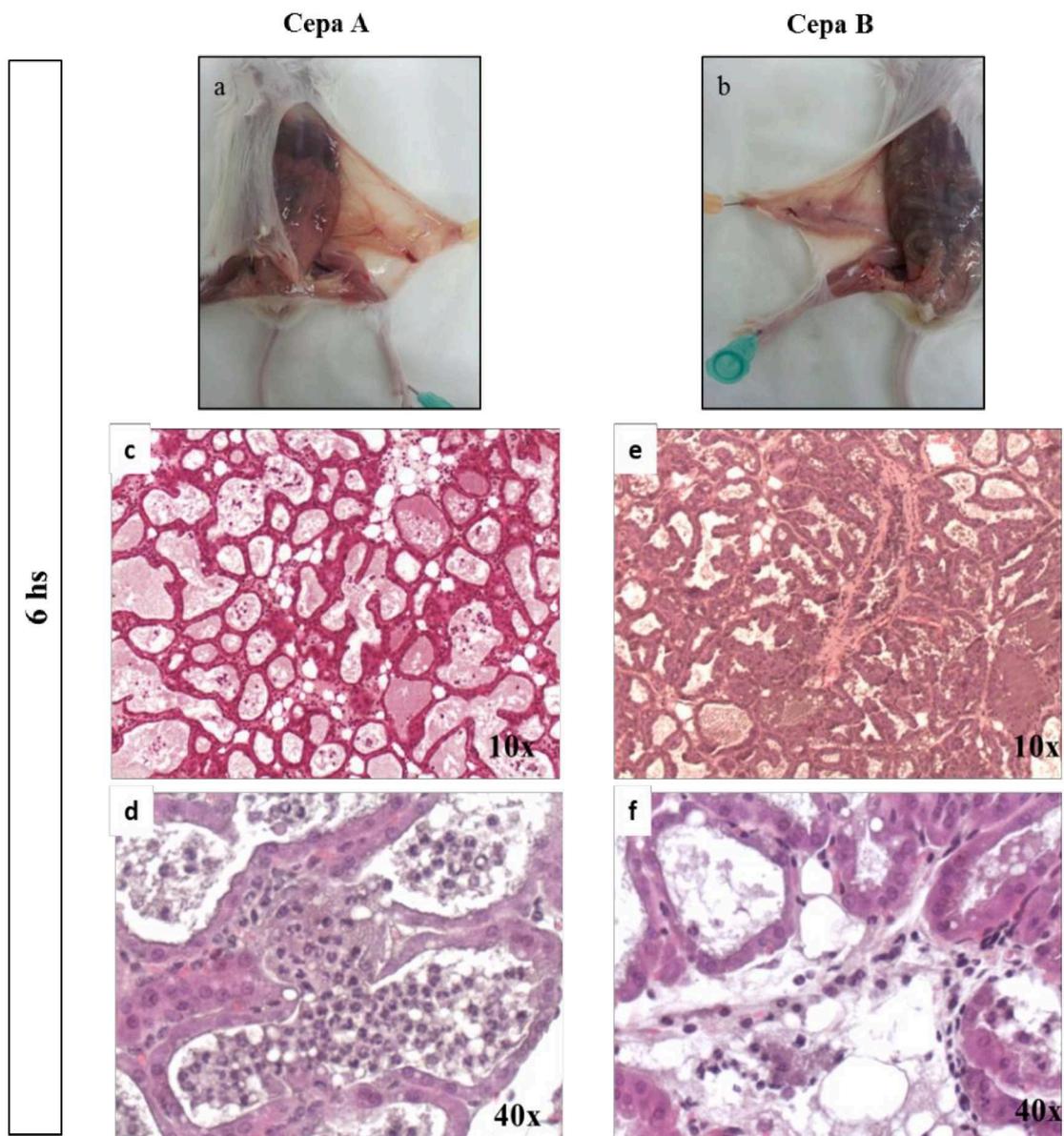


Figura 25: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas a las 6 hs post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En las GM inoculadas con la cepa B, macroscópicamente, no se observaron lesiones aparentes (Figura 25b). Microscópicamente, las lesiones fueron similares a las descritas para la cepa A, observándose en zonas delimitadas del parénquima mamario, conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes con conservación de la estructura epitelial. En el tejido conjuntivo que rodea a conductos y alvéolos y alrededor de los vasos sanguíneos se observó infiltrado de neutrófilos y macrófagos (Figuras 25e, f). Al igual que con la cepa A, también se observaron zonas del parénquima mamario con la estructura conservada sin lesiones aparentes.

En la Figura 26 se muestran las lesiones macro y microscópicas a las 12 hs luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

En las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 26a). A la observación microscópica y en zonas definidas del parénquima mamario, se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes con conservación de la estructura epitelial. En el tejido conjuntivo que rodea vasos sanguíneos y conductos mamarios se observó infiltrado de neutrófilos y macrófagos (Figuras 26c, d). En otras zonas del mismo corte histológico, se observó exudado en el interior de los alvéolos y conductos con abundantes neutrófilos, macrófagos y células epiteliales desprendidas con leve alteración de la estructura de la pared alveolar. También se observaron zonas definidas del parénquima mamario sin lesiones aparentes.

En las GM inoculadas con la cepa B, macroscópicamente, al igual que con la cepa A, no se observaron lesiones aparentes (Figura 26b). Microscópicamente, en zonas definidas del parénquima mamario, se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes con conservación de la estructura epitelial. En el tejido conjuntivo que rodea a conductos y alvéolos y alrededor de los vasos sanguíneos se observó infiltrado de neutrófilos y macrófagos (Figuras 26e,f). Al igual que con la cepa A, también se observaron zonas del parénquima mamario con la estructura conservada sin lesiones aparentes.

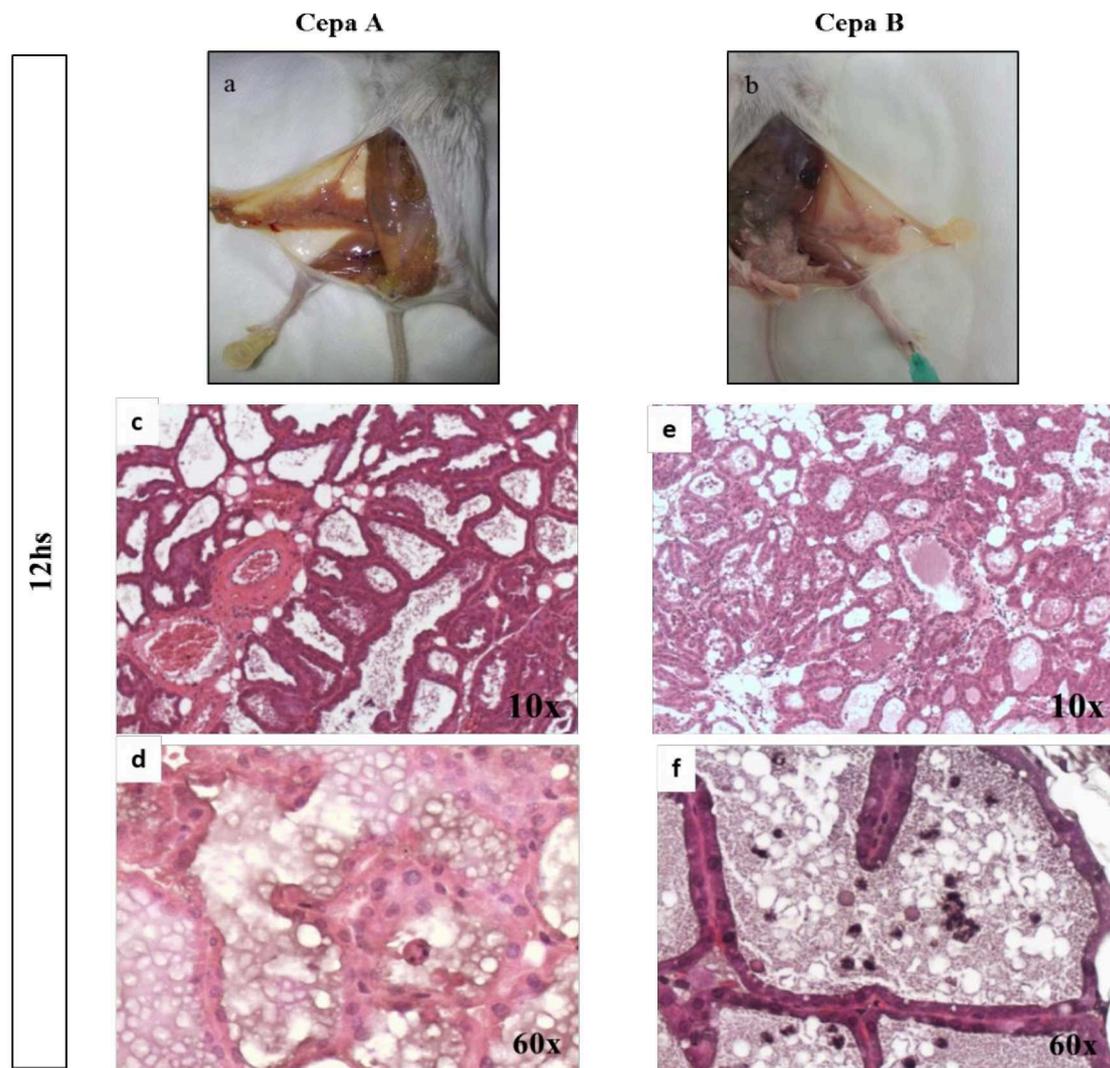


Figura 26: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas a las 12 hs post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En la Figura 27 se muestran las lesiones macro y microscópicas a las 24 hs luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

En las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*, se observó macroscópicamente mastitis focalizada extensa con marcado enrojecimiento del tejido mamario (hiperemia activa) (Figura 27a). A la observación microscópica, se evidenciaron áreas extensas del parénquima mamario dañado, con pérdida de la arquitectura normal del tejido e hiperemia (Figura 27c). Presencia de abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en el interior de conductos y alvéolos (Figura 27d).

En las GM inoculadas con la cepa B, macroscópicamente, se observó mastitis focalizada extensa con marcado enrojecimiento del tejido mamario (hiperemia activa) (Figura 27b). Microscópicamente, en zonas definidas del parénquima mamario, se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes con conservación de la estructura epitelial (Figuras 27e,f). En otras zonas del mismo corte histológico, se observó exudado en el interior de los alvéolos y conductos con abundantes neutrófilos, macrófagos y células epiteliales desprendidas con alteración de la estructura de la pared alveolar.

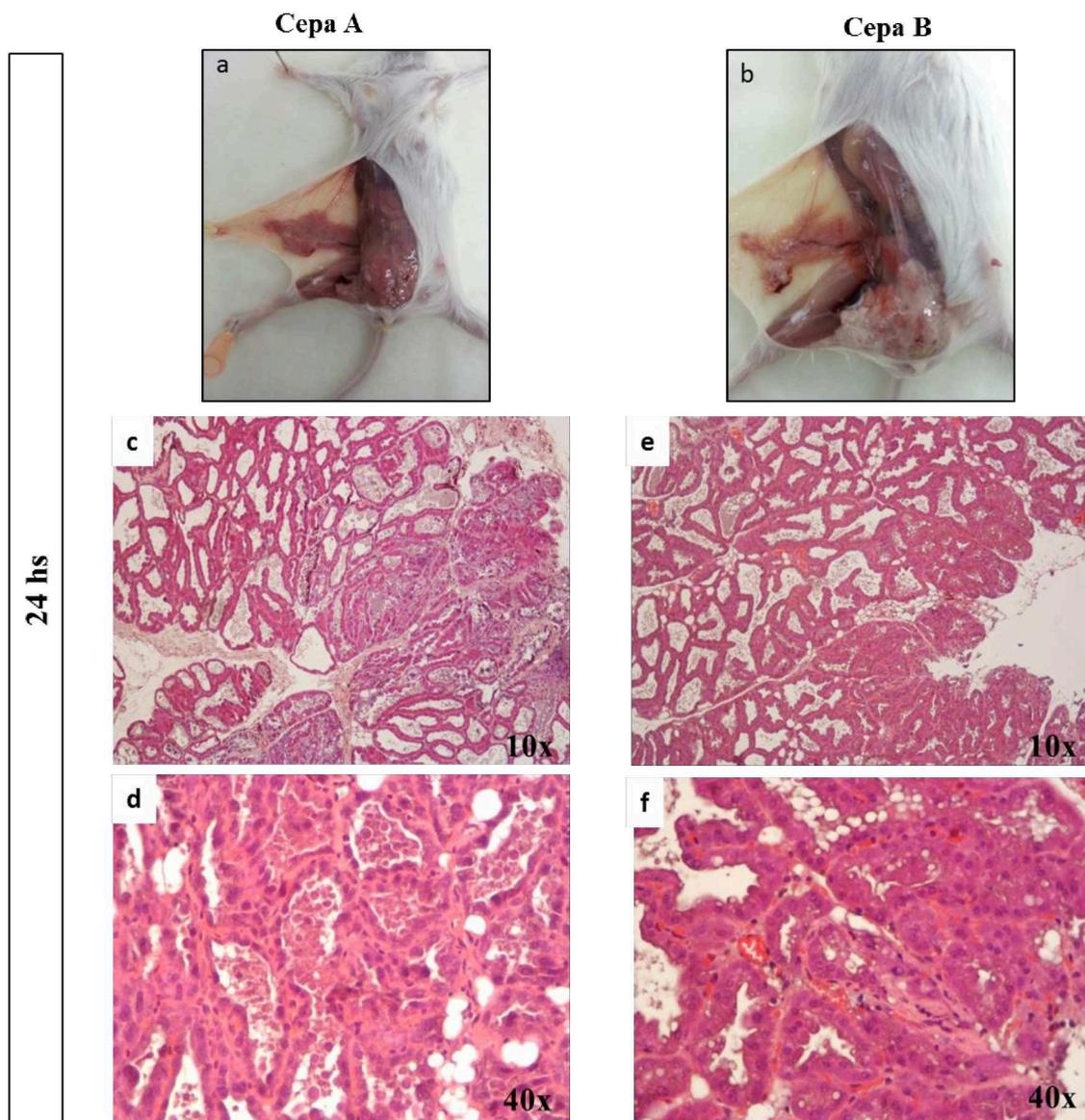


Figura 27: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas a las 24 hs post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

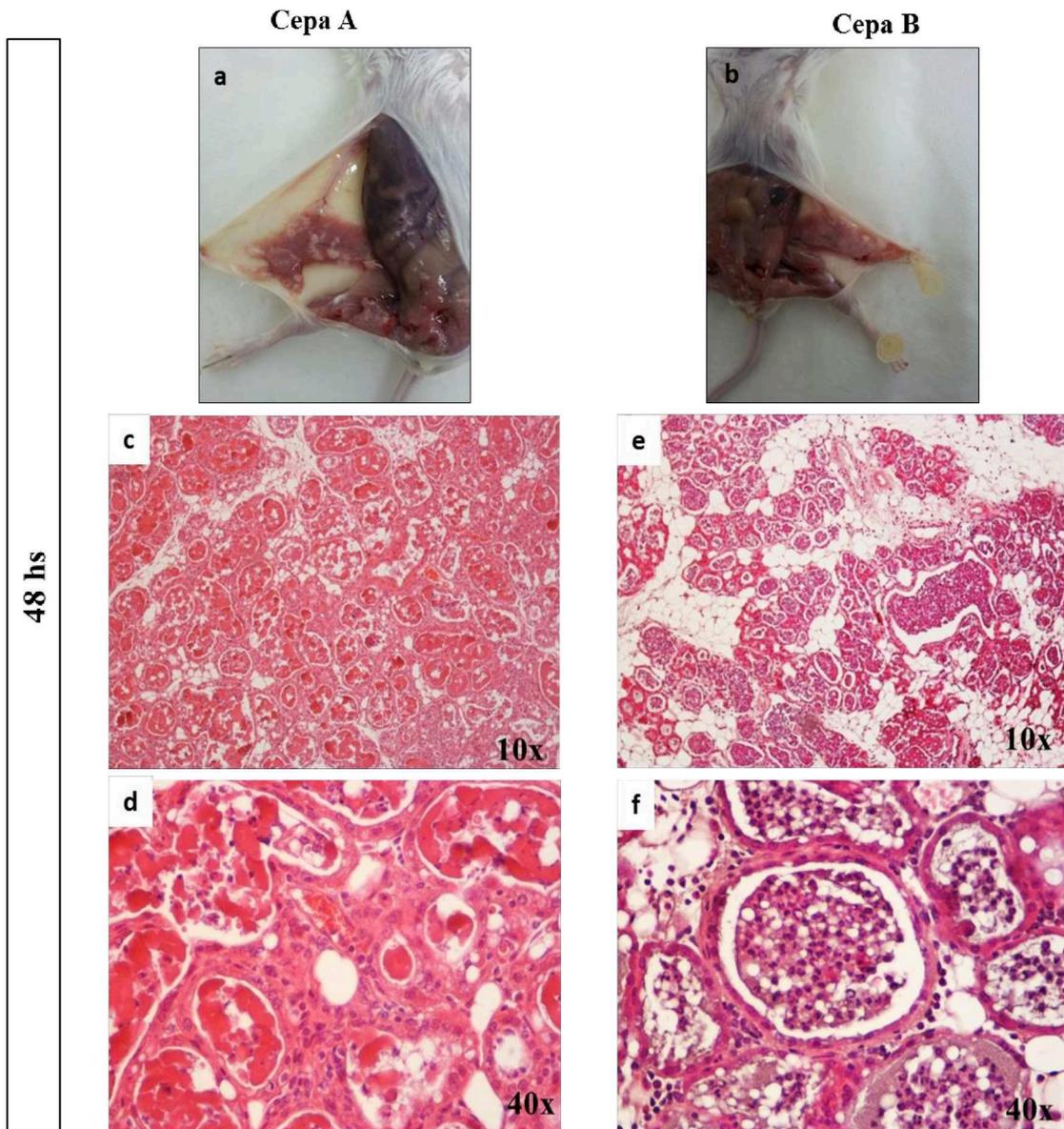


Figura 28: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas a las 48 hs post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En la Figura 28 se muestran las lesiones macro y microscópicas a las 48 hs luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*. En las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*, macroscópicamente, se evidenció mastitis supurativa multifocal a coalescente aguda, moderada (Figura 28a). Se observaron lesiones múltiples irregulares de diferentes tamaños, color blanco, al corte rezumó un líquido espeso, cremoso (pus). Microscópicamente se observaron áreas extensas de tejido dañado con hiperemia (Figura 28c), presencia de abundante exudado de

neutrófilos, macrófagos y células epiteliales desprendidas en las luces de conductos y alvéolos. En otras áreas del mismo corte histológico se observaron focos de necrosis con pérdida de la estructura alveolar (Figura 28d) y leve proliferación de tejido conjuntivo.

En las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*, macroscópicamente se evidenció mastitis focalmente extensa y marcado enrojecimiento del tejido mamario (hiperemia activa) (Figura 28b). Microscópicamente se observó presencia de abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en las luces de conductos y alvéolos con conservación de la estructura epitelial (Figuras 28e,f). En otras zonas del parénquima, se observó exudado con abundantes neutrófilos y alteración de la estructura alveolar con paredes irregulares, células epiteliales desprendidas en los lúmenes y macrófagos con citoplasmas de aspecto vacuolado. En el tejido conjuntivo interalveolar se observó hiperemia, infiltrado de macrófagos, linfocitos y eosinófilos.

En la Figura 29 se muestran las lesiones macro y microscópicas a las 72 hs luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

En las GM inoculadas con la cepa A, macroscópicamente se observó mastitis focalmente extensa y marcado enrojecimiento del tejido mamario (hiperemia activa) (Figura 29a). Microscópicamente, se evidenciaron focos de necrosis con pérdida de la estructura alveolar y leve proliferación de tejido conjuntivo, observándose cambios nucleares como picnosis y cariorrexis (Figuras 29c,d). Infiltrado leucocitario mixto difuso en el tejido conjuntivo interalveolar.

Con la cepa B, macroscópicamente se observó marcado enrojecimiento del tejido mamario (Figura 29b). Microscópicamente, en zonas definidas del parénquima se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes con conservación de la estructura epitelial. En otras zonas del mismo corte histológico, se observó exudado con abundantes neutrófilos y alteración de la estructura alveolar con paredes irregulares, células epiteliales desprendidas en los lúmenes y macrófagos con citoplasmas de aspecto vacuolado. En el tejido conjuntivo se observó hiperemia, infiltrado de macrófagos, linfocitos y eosinófilos (Figuras 29e,f).

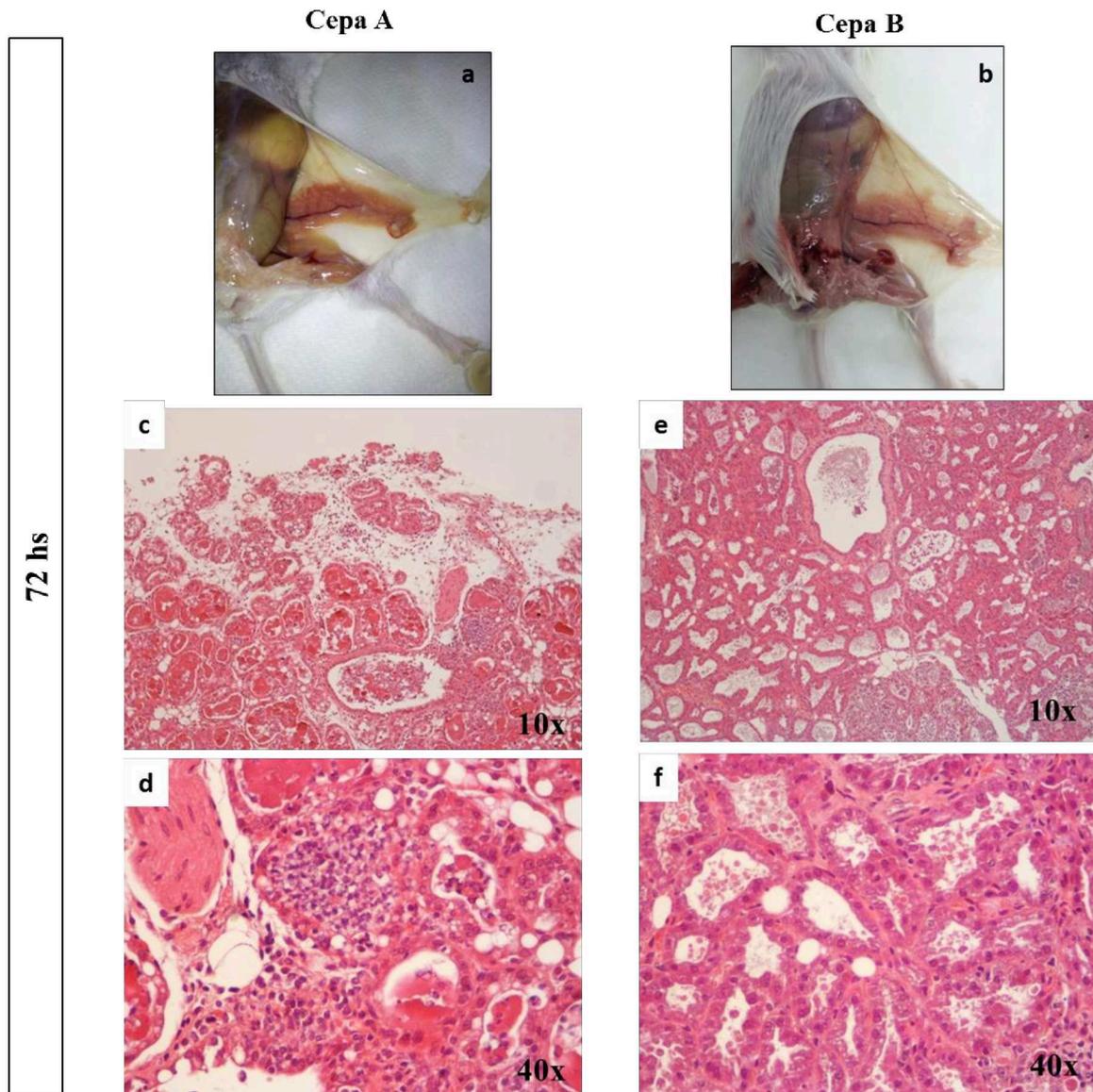


Figura 29: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas a las 72 hs post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En la Figura 30 se muestran las lesiones macro y microscópicas a las 96 hs luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

En las GM inoculadas con la cepa A, macroscópicamente se observó inflamación moderada con ligero enrojecimiento del tejido mamario (Figura 30a). Microscópicamente, se observaron focos de necrosis con pérdida de la estructura de alveolar y proliferación de tejido conjuntivo (Figura 30c), presencia de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar (Figura 30d).

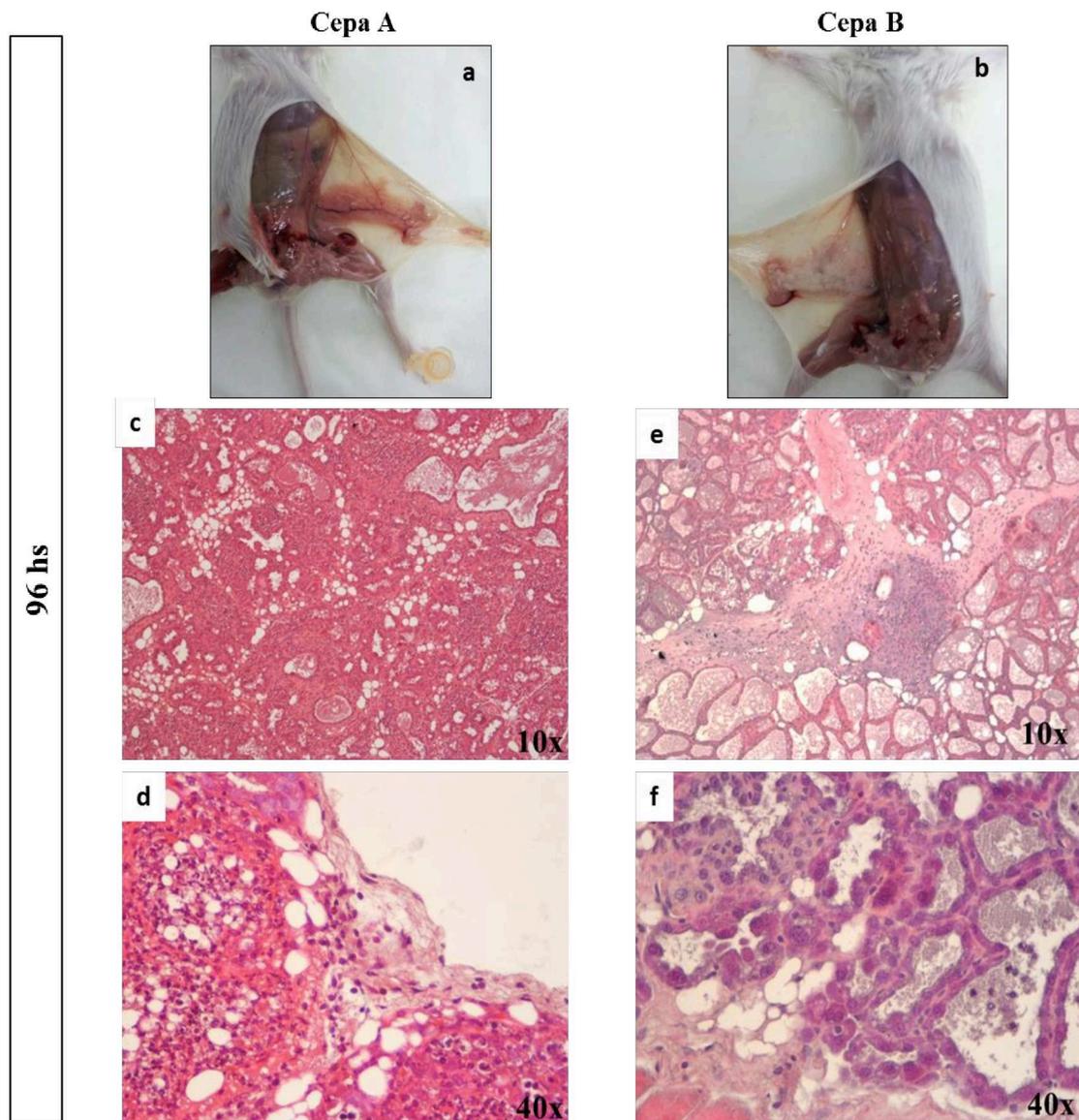


Figura 30: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas a las 96 hs post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

Con la cepa B, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 30b). Microscópicamente se observó presencia de infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar, exudado con abundantes neutrófilos y alteración de la estructura alveolar con paredes irregulares, células epiteliales desprendidas en los lúmenes y macrófagos con citoplasmas de aspecto vacuolado. En el tejido conjuntivo interlobulillar se observó, infiltrado de macrófagos, linfocitos y eosinófilos (Figuras 30e,f).

En la Figura 31 se muestran las lesiones macro y microscópicas al día 5 luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

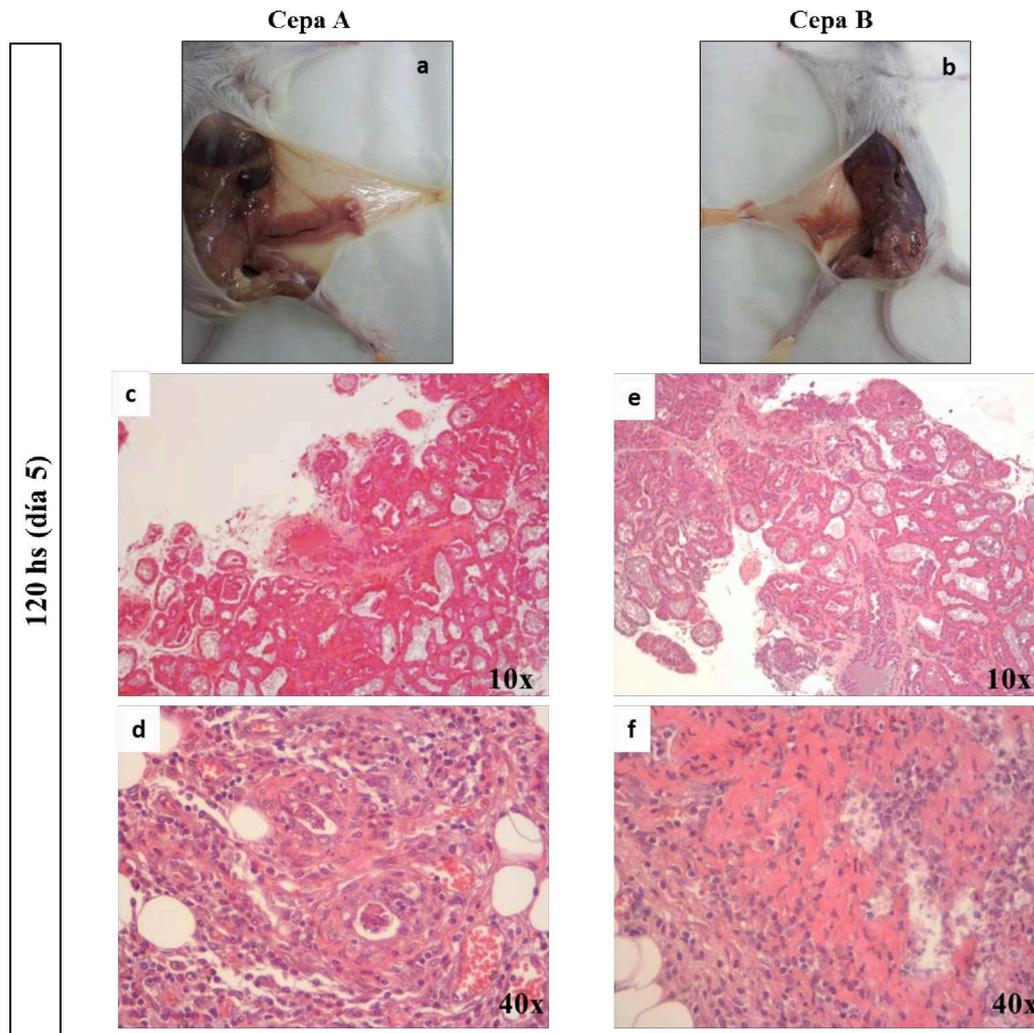


Figura 31: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas al día 5 post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En las GM inoculadas con la cepa A, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 31a). Microscópicamente, se evidenciaron zonas de parénquima normal y otras áreas con abundante infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar, leve hiperplasia epitelial de conductos, gran cantidad de macrófagos, fibroblastos y fibras colágenas. Presencia de focos con neutrófilos y proliferación del tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones (Figuras 31c,d).

Con la cepa B, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 31b). Microscópicamente, coexistieron en el mismo corte alvéolos activos secretores y

conductos con estructura conservada, y áreas focalizadas de alvéolos afuncionales con luces irregulares y en sectores, pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones y focos de alvéolos con exudado de neutrófilos en sus lúmenes (Figuras 31d,f).

En la Figura 32 se muestran las lesiones macro y microscópicas al día 7 luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

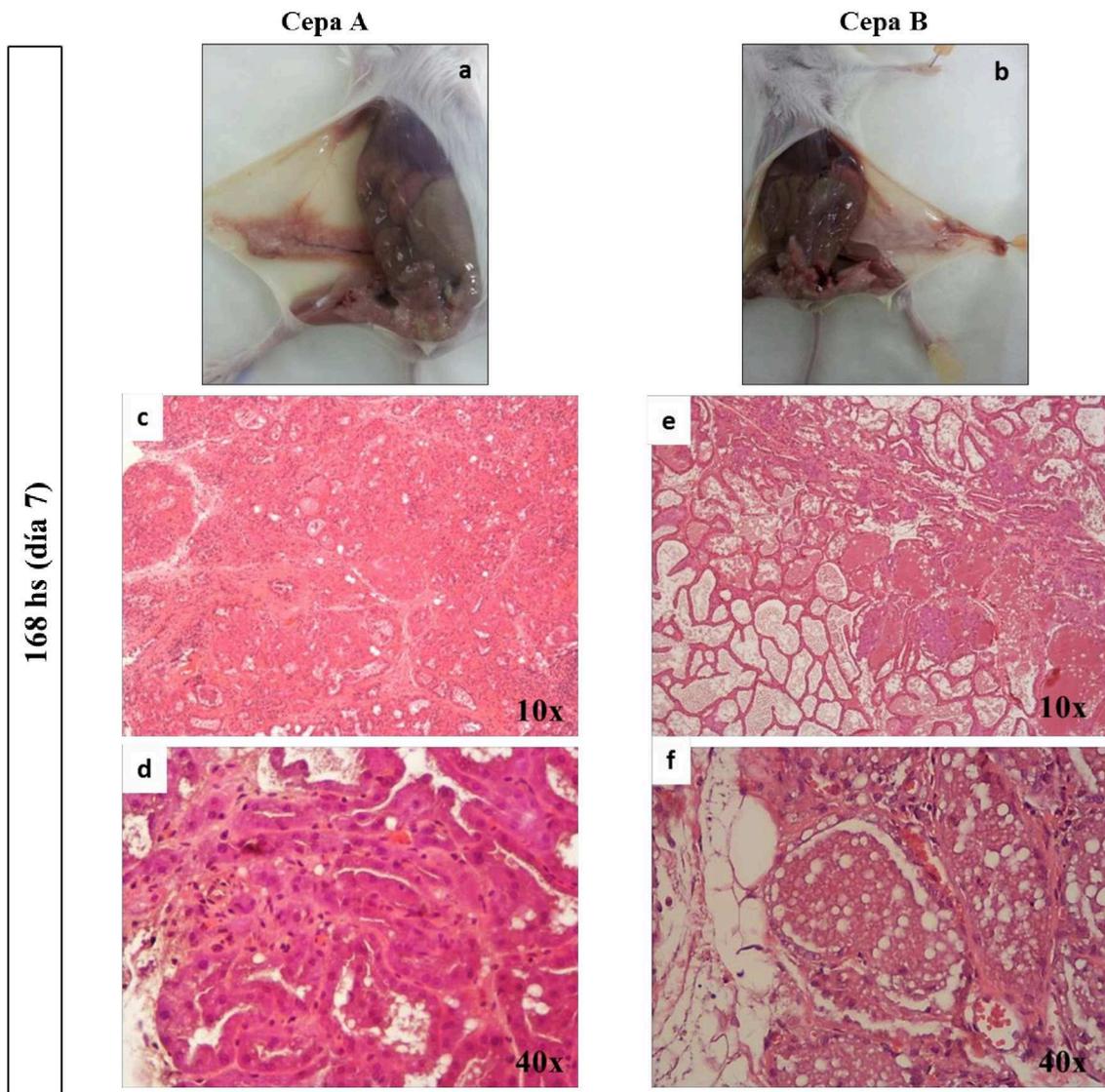


Figura 32: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas al día 7 post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En las GM inoculadas con la cepa A, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 32a). Microscópicamente se evidenciaron extensas áreas

focalizadas con pérdida de la arquitectura normal del tejido, con reemplazo del parénquima mamario por tejido conjuntivo denso con escaso infiltrado de linfocitos y presencia de fibroblastos y restos de células epiteliales. Se observaron lobulillos con alvéolos inactivos y de pequeño tamaño (Figuras 32c,d).

Con la cepa B, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes. Microscópicamente se evidenciaron áreas focalizadas de alvéolos afuncionales con luces irregulares, y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones y focos de alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes (Figuras 32e,f).

En la Figura 33 se muestran las lesiones macro y microscópicas al día 9 luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

Con la cepa A, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 33a). Microscópicamente se observaron focos múltiples de necrosis de epitelios alveolares (picnosis, cariorrexis, cariólisis) y restos celulares. Epitelios tubulares con hiperplasia y desorden de la arquitectura normal del tejido mamario. Áreas extensas de tejido con pérdida de la arquitectura, infiltrados linfoplasmocitario con abundantes macrófagos y gran proliferación de tejido conjuntivo denso (Figuras 33c,d).

Con la cepa B, macroscópicamente se observaron áreas de tejido mamario sin lesiones aparentes y áreas con lesiones múltiples supurativas de pequeño tamaño y color blanco (Figura 33b). Microscópicamente, se evidenciaron áreas focalizadas de alvéolos afuncionales con luces irregulares, y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo denso circunscribiendo las lesiones y focos de alvéolos con exudado de neutrófilos en sus lúmenes (Figuras 33e,f).

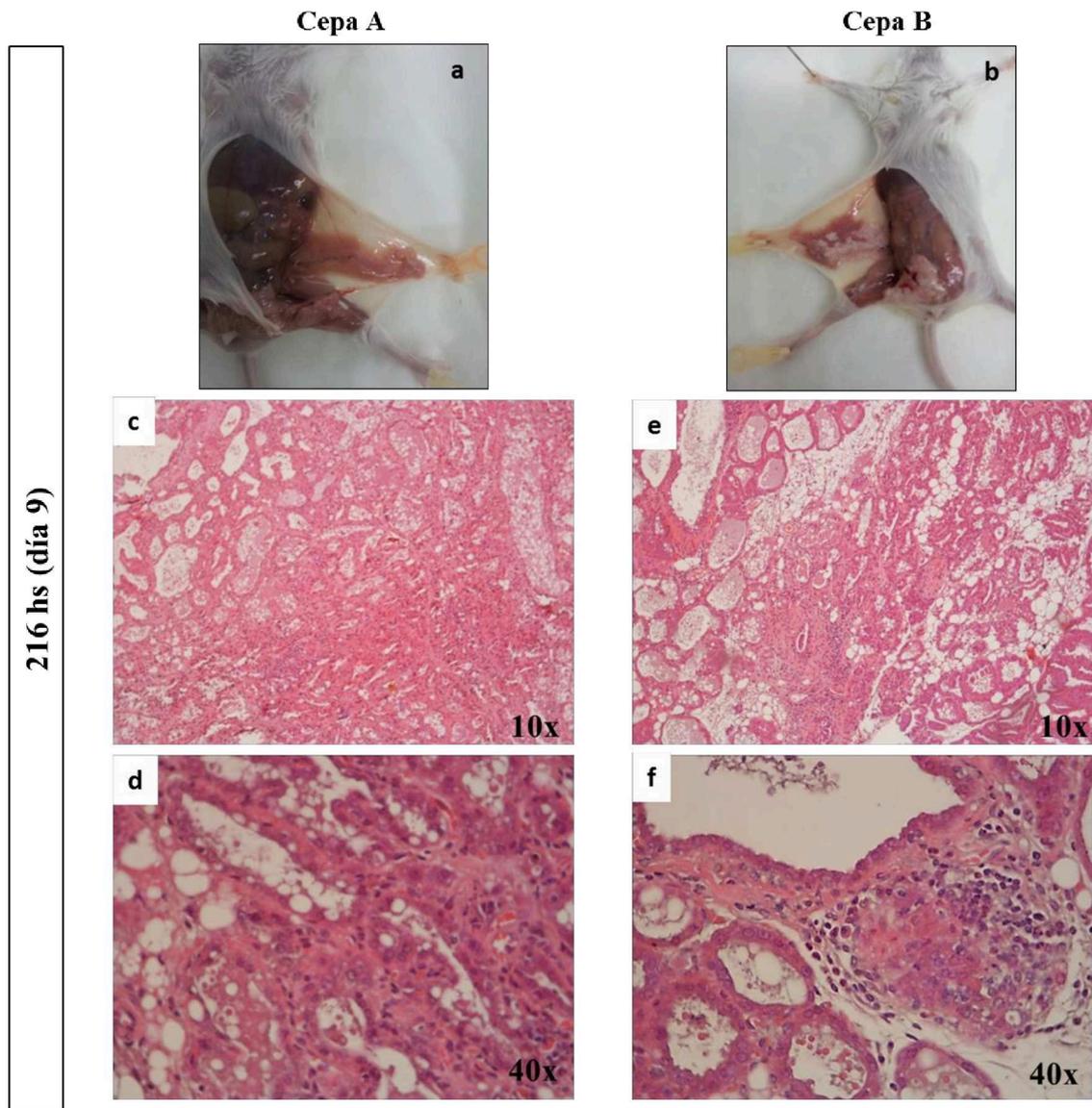


Figura 33: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas al día 9 post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. a descripción de las lesiones se realiza en el texto.

En la Figura 34 se muestran las lesiones macro y microscópicas al día 11 luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A y B de *S. aureus*.

En las GM inoculadas con la cepa A, macroscópicamente no se observaron lesiones aparentes (Figura 34a). Microscópicamente, se evidenciaron focos múltiples de necrosis de epitelios alveolares (picnosis, cariorrexis, cariólisis) y restos celulares. Epitelios tubulares con hiperplasia y desorden de la arquitectura normal del tejido mamario. Áreas extensas de tejido con pérdida de la arquitectura, infiltrados linfoplasmocitarios con abundantes macrófagos y gran proliferación de tejido conjuntivo (Figuras 34c,d).

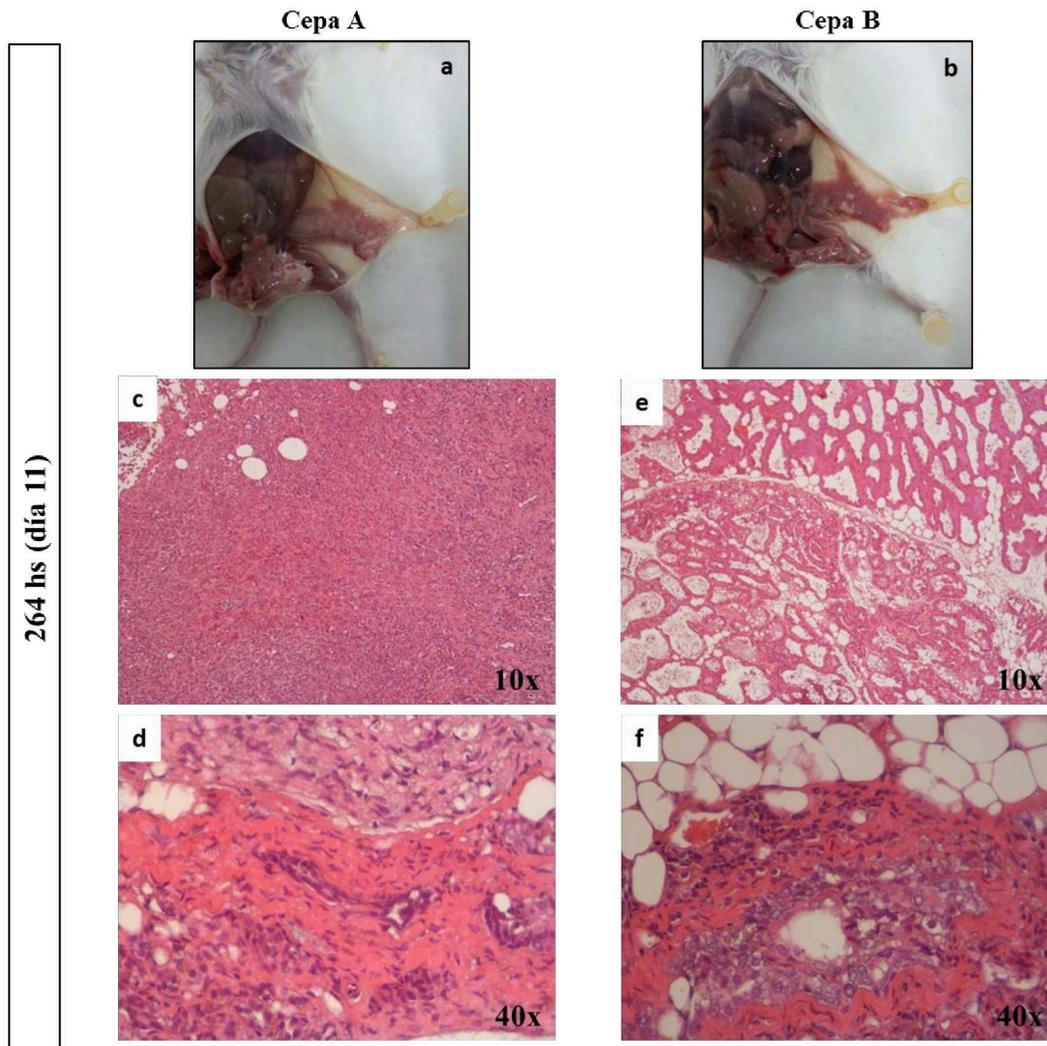


Figura 34: Imágenes representativas de glándulas mamarias de ratón inoculadas con 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (a) y B (b) de *S. aureus* obtenidas al día 11 post inoculación. Las figuras c y d muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa A de *S. aureus*. Las figuras e y f muestran las lesiones histopatológicas inducidas por la cepa B de *S. aureus*. La descripción de las lesiones se realiza en el texto.

Con la cepa B, macroscópicamente se observaron áreas de tejido mamario sin lesiones aparentes y áreas con lesiones múltiples supurativas de pequeño tamaño y color blanco (Figura 34b). Microscópicamente coexistieron en el mismo corte áreas de parénquima con alvéolos activos secretores y conductos con estructura conservada, y áreas focalizadas de alvéolos afuncionales con luces irregulares, y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones y focos de alvéolos con exudado de neutrófilos en sus lúmenes (Figuras 34e,f).

Tabla 24: Resumen de las lesiones macro y microscópicas inducidas por las cepas A y B de *S. aureus* en diferentes tiempos post infección.

Lesiones macroscópicas (macro) y microscópicas (micro)		
Tiempo (hs)	Cepa A de S. aureus	Cepa B de S. aureus
6	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Áreas focalizadas con exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos. Estructura epitelial conservada. Infiltrado de neutrófilos y macrófagos en el tejido conjuntivo perivascular y perialveolar. Zonas del tejido sin lesiones aparentes.	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Áreas focalizadas con exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos. Estructura epitelial conservada. Infiltrado de neutrófilos y macrófagos en el tejido conjuntivo perivascular y perialveolar. Zonas del tejido sin lesiones aparentes.
12	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Áreas focalizadas con exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos y estructura epitelial conservada y áreas con pérdida de la estructura epitelial. Infiltrado de neutrófilos y macrófagos en el tejido conjuntivo perivascular y perialveolar. Zonas del tejido sin lesiones.	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Áreas focalizadas con exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos y estructura epitelial conservada. Infiltrado de neutrófilos y macrófagos en el tejido conjuntivo perivascular y perialveolar. Zonas del tejido sin lesiones aparentes.
24	Macro: Mastitis focalizada extensa con hiperemia activa. Micro: Abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos y pérdida de la arquitectura normal del tejido en áreas extensas.	Macro: Mastitis focalizada extensa con hiperemia activa. Micro: Zonas focalizadas con exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos y conservación de la estructura epitelial. Zonas con pérdida de la estructura epitelial.
48	Macro: Mastitis supurativa multifocal a coalescente aguda, moderada. Micro: Abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos y pérdida de la arquitectura normal del tejido en áreas extensas. Hiperemia, focos de necrosis y leve proliferación del tejido conjuntivo.	Micro: Mastitis focalmente extensa e hiperemia activa. Micro: Áreas focalizadas con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos con conservación de la estructura epitelial y áreas focalizadas con pérdida de la estructura epitelial. Hiperemia e infiltrado de macrófagos, linfocitos y eosinófilos en el tejido conjuntivo interalveolar.
72	Macro: Mastitis focalmente extensa e hiperemia activa. Micro: Focos de necrosis con pérdida de la estructura alveolar y leve proliferación de tejido conjuntivo. Infiltrado leucocitario mixto difuso en el tejido conjuntivo interalveolar.	Macro: Marcado enrojecimiento del tejido (hiperemia activa). Micro: Áreas focalizadas con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en conductos y alvéolos con conservación de la estructura epitelial y áreas focalizadas con pérdida de la estructura epitelial. Hiperemia e infiltrado de macrófagos, linfocitos y eosinófilos en el tejido conjuntivo interalveolar.
96	Macro: Inflamación moderada con ligero enrojecimiento del tejido. Micro: Focos de necrosis con pérdida de la estructura de alveolar y proliferación de tejido conjuntivo. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar.	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Abundante exudado de neutrófilos en alvéolos y conductos con alteración de la estructura epitelial. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar, Infiltrado de macrófagos, linfocitos y eosinófilos en el tejido conjuntivo interlobulillar.
120	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Zonas de parénquima normal y áreas con abundante infiltrado linfoplasmocitario perialveolar, leve hiperplasia epitelial de conductos, gran cantidad de macrófagos, fibroblastos. Focos con neutrófilos y proliferación del tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones.	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Áreas focalizadas de alvéolos activos secretores y conductos con estructura conservada y áreas focalizadas de alvéolos afuncionales y pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones. Focos de alvéolos con exudado de neutrófilos en sus lúmenes.
168	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Extensas áreas focalizadas con pérdida de la arquitectura normal del tejido, abundante tejido conjuntivo denso con escaso infiltrado de linfocitos y presencia de fibroblastos. Lobulillos con alvéolos inactivos.	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Áreas focalizadas de alvéolos afuncionales y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones. Focos de alvéolos con exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes.
216	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Focos múltiples de necrosis. Epitelios tubulares con hiperplasia y áreas extensas de tejido con pérdida de la arquitectura e infiltrado linfoplasmocitario, macrófagos y proliferación del tejido conjuntivo denso.	Macro: Zonas sin lesiones y zonas con mastitis supurativa. Micro: Áreas focalizadas de alvéolos afuncionales y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo denso. Focos de alvéolos con exudado de neutrófilos.
264	Macro: Sin lesiones aparentes. Micro: Focos múltiples de necrosis. Epitelios tubulares con hiperplasia y áreas extensas de tejido con pérdida de la arquitectura e infiltrado linfoplasmocitario, macrófagos y proliferación del tejido conjuntivo denso.	Macro: Zonas sin lesiones y zonas con mastitis supurativa. Micro: Áreas focalizadas de alvéolos afuncionales y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo denso. Focos de alvéolos con exudado de neutrófilos.

4.9.4. Evaluación de componentes celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa

4.9.4.1. Cuantificación de monocitos-macrófagos mediante la expresión de CD14

Dentro de los componentes celulares de la respuesta inmune innata se cuantificaron monocitos-macrófagos utilizando un anticuerpo específico (anti CD14) por IHQ en cortes de tejido mamario murino. En la Figura 35 se observan monocitos-macrófagos inmunomarcados con anti CD14 luego de la inoculación IM de las cepas A y B de *S. aureus* y en controles inoculados con solución fisiológica. Las imágenes son representativas y corresponden a uno de los periodos pi (96 hs) de todos los tiempos evaluados. La marcación se observó en el citoplasma de los monocitos-macrófagos (Figura 35).

En la Figura 36 se muestran las medias y DE del número de monocitos-macrófagos inmunomarcados/superficie de área para los diferentes tratamientos aplicados y en los diferentes tiempos pi. A través del análisis estadístico de los datos, se evaluaron los efectos individuales del tiempo de muestreo, de los tratamientos aplicados y de la interacción entre ambos factores sobre el número de monocitos-macrófagos **CD14** positivos a la inmunomarcación/mm². El número de monocitos-macrófagos se vio influenciado por los tratamientos aplicados ($P < 0,0001$) y por el tiempo de muestreo ($P < 0,0001$), observándose además interacción entre estos factores ($P < 0,0001$). El número de células inmunopositivas fue mayor en las GM infectadas con las cepas A y B de *S. aureus* con respecto a las inoculadas con solución fisiológica a lo largo de todo el periodo de muestreo ($P < 0,05$).

A las 6 horas pi, se observaron diferencias en el número de monocitos-macrófagos/mm² entre las cepas A y B de *S. aureus* y las inoculadas con solución fisiológica, observándose el mayor número de células en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*. A las 12, 24 y 48 horas pi se observó un aumento gradual en el número de monocitos-macrófagos/mm², el cual fue similar entre las cepas A y B de *S. aureus* y mayor con respecto a las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$).

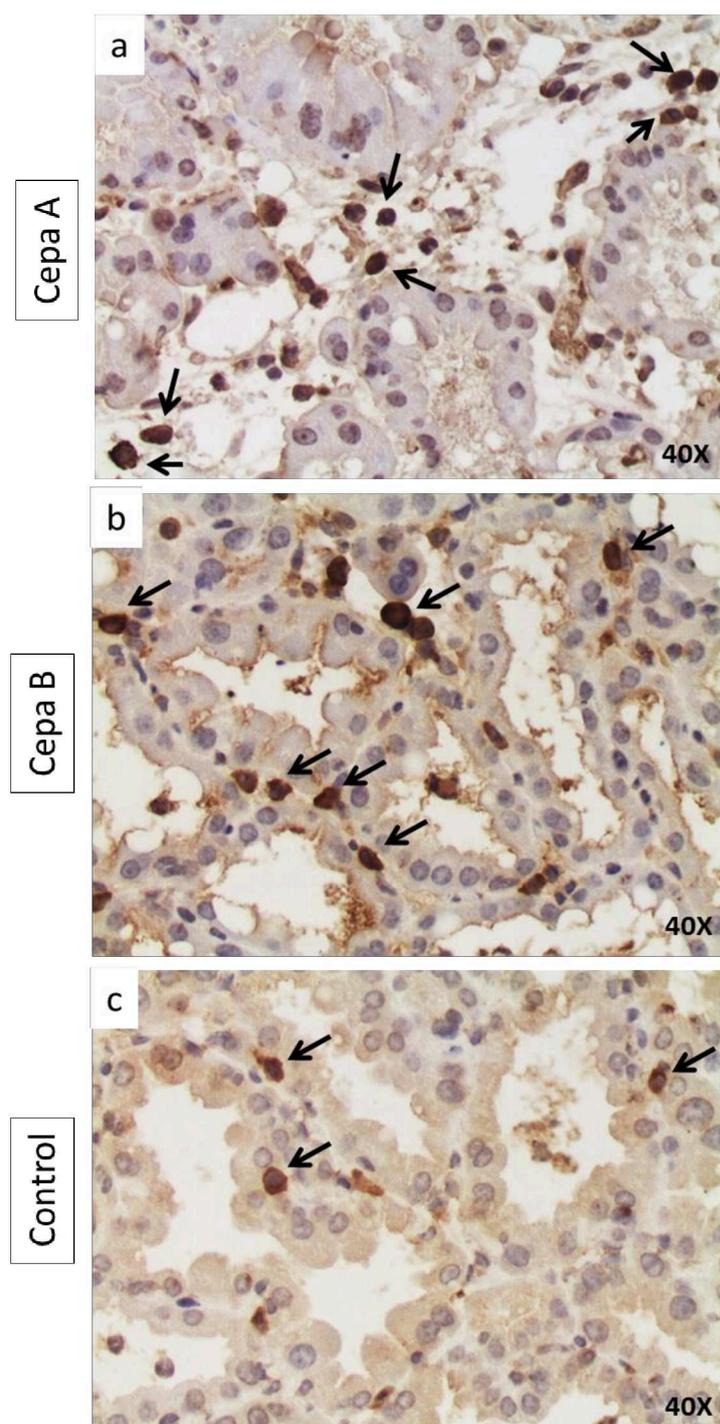


Figura 35: Inmunomarcación de monocitos-macrófagos con anti CD14 en tejido mamario murino a las 96 hs post inoculación de las cepas A y B de *S. aureus* y en controles inoculados con solución fisiológica. Las flechas muestran monocitos-macrófagos reactivos al cromógeno utilizado. (a) Glándula mamaria inoculada con la cepa A de *S. aureus*. (b) Glándula mamaria inoculada con la cepa B de *S. aureus*. (c) Glándula mamaria inoculada con solución fisiológica (control).

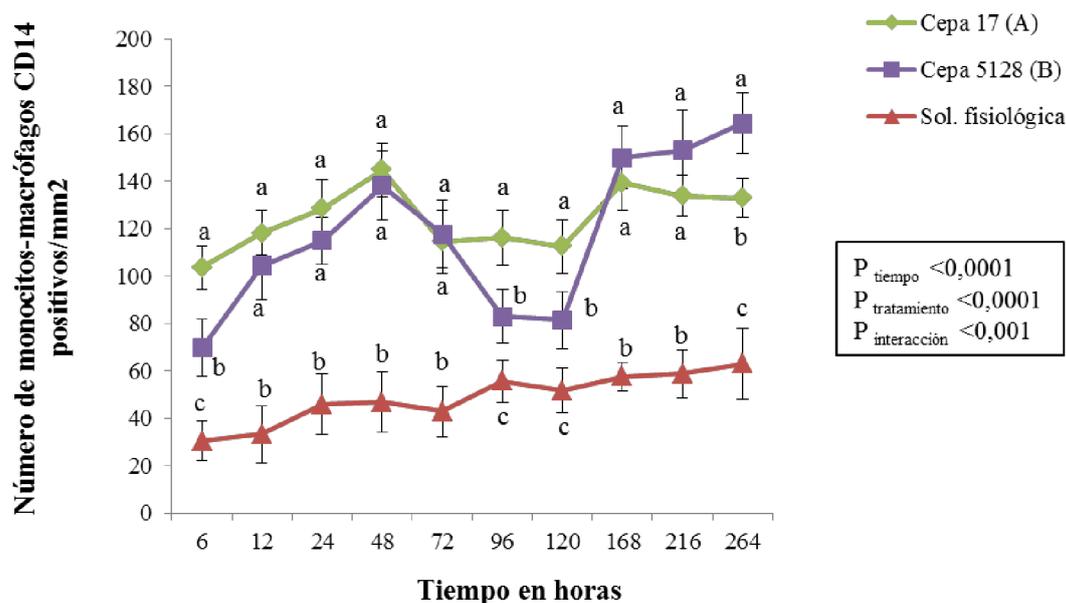


Figura 36: Número de monocitos-macrófagos CD14 positivos/mm² en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de *S. aureus* y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos. Se muestran los efectos principales de los tratamientos aplicados y del tiempo de muestreo así como de la interacción entre ambos factores. Para cada tiempo (horas), diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Si bien no se observaron diferencias estadísticas en el número de monocitos-macrófagos entre las cepas A y B de *S. aureus* a las 12, 24 y 48 horas pi, el número de células inmunomarcadas fue mayor en las GM inoculadas con la cepa A en los tres tiempos de muestreo. A las 72 horas pi se observó una disminución en el número de monocitos-macrófagos en las GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus* con respecto al periodo anterior (48 horas), siendo el número de células cuantificadas similar entre las GM inoculadas con ambas cepas y mayor con respecto a las inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 96 y 120 horas pi se observó una disminución marcada en el número de monocitos-macrófagos inmunomarcados en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus* difiriendo en forma significativa con respecto al número de células cuantificadas en las GM inoculadas con la cepa A y con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 168 horas pi el número de monocitos-macrófagos cuantificados en las GM inoculadas con la cepa B aumentó en forma marcada con respecto al periodo anterior alcanzando números similares al observado con la cepa A, difiriendo con respecto a las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 216 horas pi, el número de monocitos-macrófagos fue mayor en las GM inoculadas con

las cepas A y B de *S. aureus* con respecto a las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). Si bien en este periodo no se observaron diferencias en el número de células entre las cepas A y B, el número de monocitos-macrófagos cuantificadas en las GM inoculadas con la cepa B fue mayor. A las 264 horas pi, se observaron diferencias entre el número de monocitos-macrófagos cuantificados en las GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus* y las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$), observándose el mayor número de células en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*.

4.9.4.2. Cuantificación de linfocitos T y linfocitos B, mediante la expresión de CD4, CD8 y CD79.

Dentro de los componentes celulares de la respuesta inmune adaptativa se cuantificaron linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y linfocitos B utilizando anticuerpos específicos (anti CD4, anti CD8 y anti CD79, respectivamente) por IHQ en cortes de tejido mamario murino.

En la Figura 37 se observan cortes histológicos de GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica inmunomarcados con anti CD4 en los cuales se visualizan linfocitos **CD4**. Las imágenes son representativas y corresponden a uno de los periodos de tiempo evaluados (96 hs pi). La marcación se observó en el citoplasma de los linfocitos CD4 (Figura 37).

En la Figura 38 se muestran las medias y DE del número de linfocitos CD4 inmunomarcados/superficie de área para los diferentes tratamientos aplicados y en los diferentes tiempos pi.

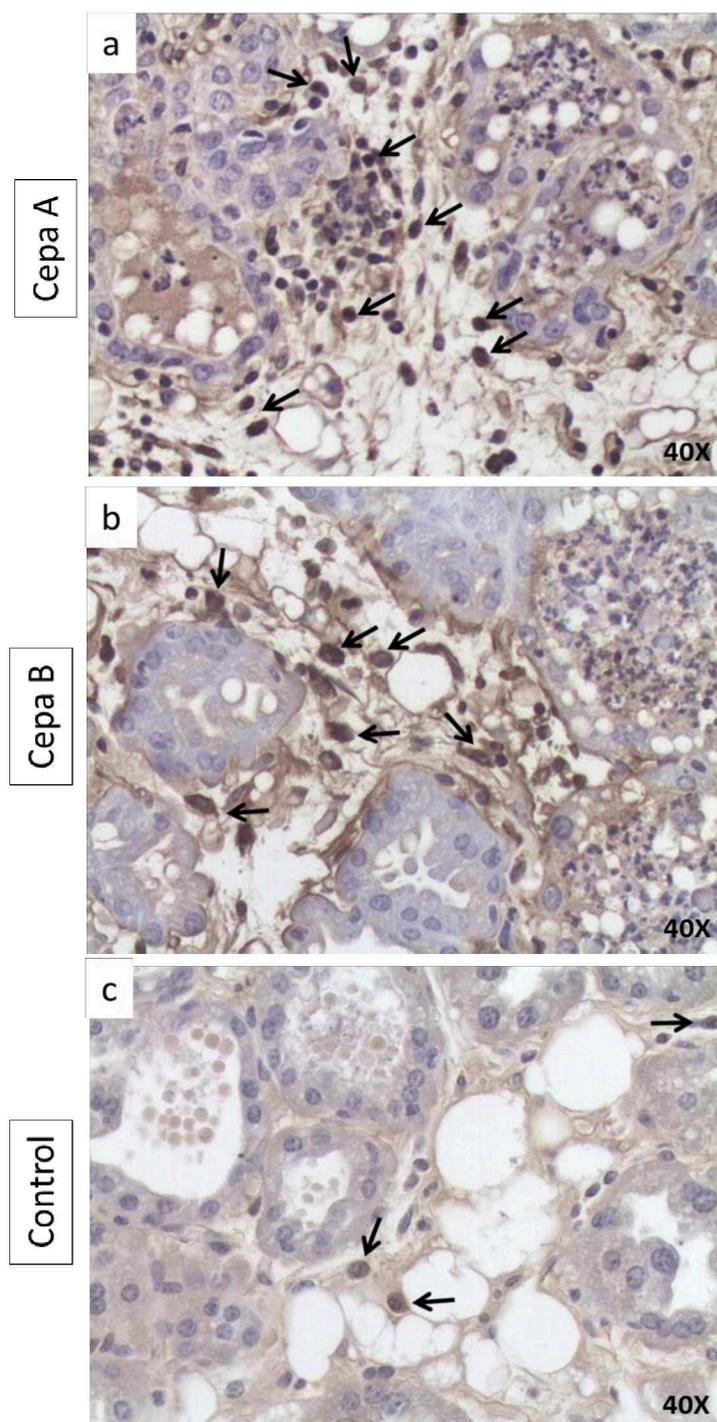


Figura 37: Inmunomarcación de linfocitos CD4 positivos en tejido mamario murino a las 96 hs post inoculación de las cepas A y B de *S. aureus* y en controles inoculados con solución fisiológica. Las flechas muestran linfocitos CD4 reactivos al cromógeno utilizado. (a) Glándula mamaria inoculada con la cepa A de *S. aureus*. (b) Glándula mamaria inoculada con la cepa B de *S. aureus*. (c) Glándula mamaria inoculada con solución fisiológica (control).

Se evaluaron los efectos individuales del tiempo de muestreo y de los tratamientos aplicados así como de la interacción entre ambos factores sobre el número de linfocitos CD4 positivos a la inmunomarcación/mm². El número de linfocitos se vio influenciado por los tratamientos aplicados ($P < 0,0001$) y por el tiempo de muestreo ($P < 0,0001$),

observándose además interacción entre estos factores ($P < 0,0001$). El número de células inmunopositivas fue mayor en las GM infectadas con las cepas A y B de *S. aureus* con respecto a las inoculadas con solución fisiológica a lo largo de todo el periodo de muestreo ($P < 0,05$).

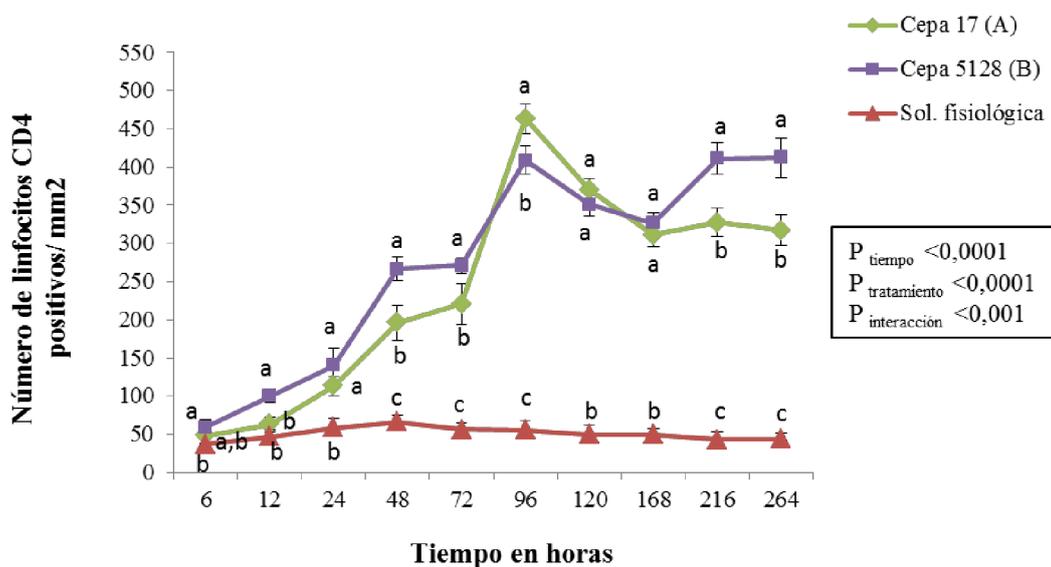


Figura 38: Número de linfocitos CD4 positivos/mm² en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de *S. aureus* y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos. Se muestran los efectos principales del tiempo de muestreo y de los diferentes tratamientos aplicados así como de la interacción entre estos factores. Para cada tiempo (horas), diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

A partir de las 6 hs y hasta las 48 hs pi se observó un aumento gradual en el número de linfocitos CD4 positivos para ambas cepas evaluadas. A las 6 hs pi el número de linfocitos CD4 fue mayor en las GM de los ratones inoculados con la cepa B difiriendo con las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$) pero no con la cepa A con la cual no se observaron diferencias ($P > 0,05$). A las 12 hs pi el número de linfocitos CD4 positivos fue mayor en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus* difiriendo con las GM inoculadas con la cepa A y las inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,059$). A las 24 hs pi el número de linfocitos CD4 positivos fue similar para ambas cepas evaluadas y mayor que el observado en las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 48 y 72 hs pi se observó un aumento gradual y

marcado de los linfocitos CD4 positivos para ambas cepas inoculadas. En ambos periodos se observaron diferencias en el número de linfocitos CD4 positivos/mm² entre las cepas A y B de *S. aureus* y las inoculadas con solución fisiológica, observándose el mayor número de células en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*. A partir de este período el número de linfocitos CD4 positivos continuó en aumento alcanzando un pico a las 96 hs pi tanto para la cepa A como para la cepa B, observándose diferencias entre ambas cepas evaluadas y con las inoculadas con solución fisiológica ($P<0,05$). En este período de muestreo el mayor número de linfocitos CD4 positivos se observó en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*. En los siguientes periodos (120 hs y 168 hs pi) se observó una disminución marcada del número de linfocitos CD4 positivos/mm² para ambas cepas inoculadas, siendo el número de células cuantificadas similar para las cepas A y B y mayor con respecto a las inoculadas con solución fisiológica ($P<0,05$). En los últimos períodos evaluados (216 hs y 264 hs pi) el número de linfocitos CD4 positivos/mm² aumentó considerablemente en las GM inoculadas con la cepa B, mostrando diferencias con respecto a las GM inoculadas con la cepa A y con solución fisiológica ($P<0,05$).

En la Figura 39 se observan cortes histológicos de GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica inmunomarcados con anti CD8 en los cuales se visualizan linfocitos **CD8**. Las imágenes son representativas y corresponden a uno de los periodos de tiempo evaluados (96 hs pi). La marcación se observó en el citoplasma de los linfocitos CD8 (Figura 39).

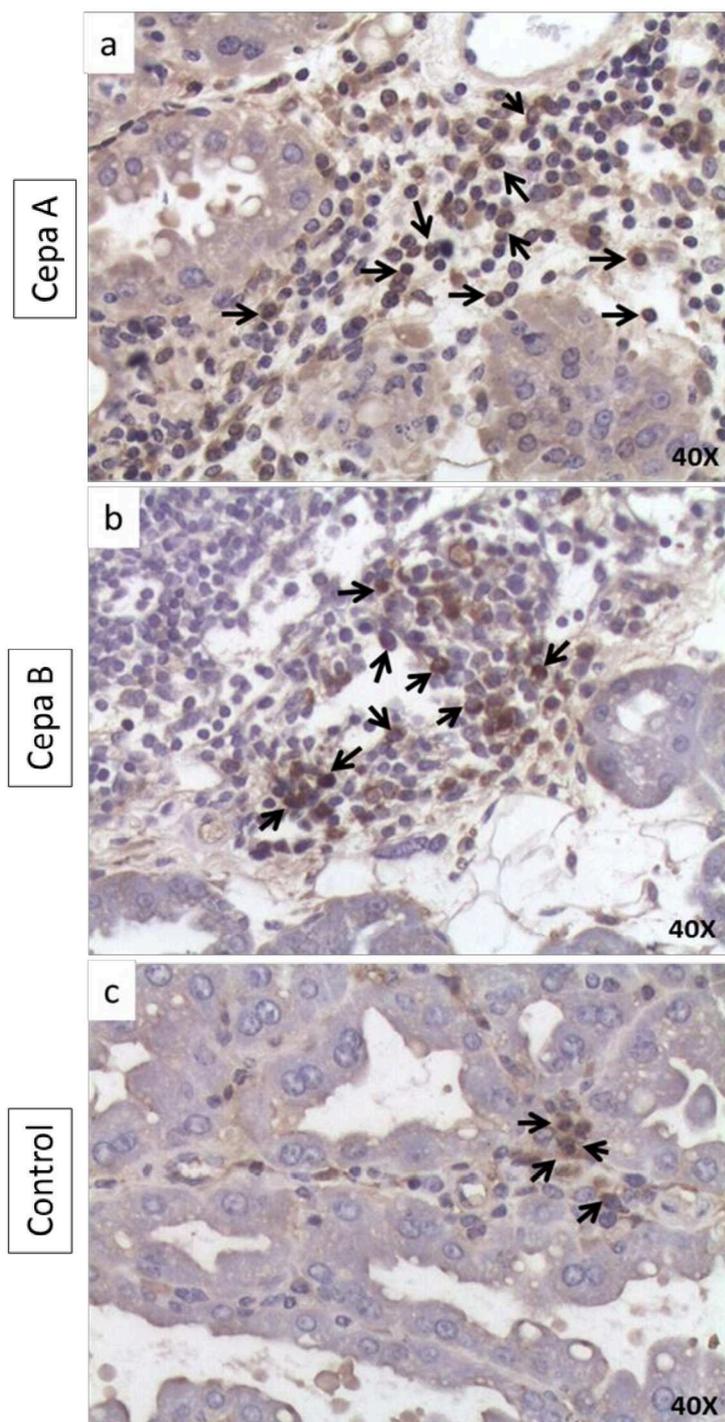


Figura 39: Inmunomarcación de linfocitos CD8 positivos en tejido mamario murino a las 96 hs post inoculación de las cepas A y B de *S. aureus* y en controles inoculados con solución fisiológica. Las flechas muestran linfocitos CD8 reactivos al cromógeno utilizado. (a) Glándula mamaria inoculada con la cepa A de *S. aureus*. (b) Glándula mamaria inoculada con la cepa B de *S. aureus*. (c) Glándula mamaria inoculada con solución fisiológica (control).

En la Figura 40 se muestran las medias y DE del número de linfocitos CD8 inmunomarcados/superficie de área para los diferentes tratamientos aplicados y en los diferentes tiempos pi.

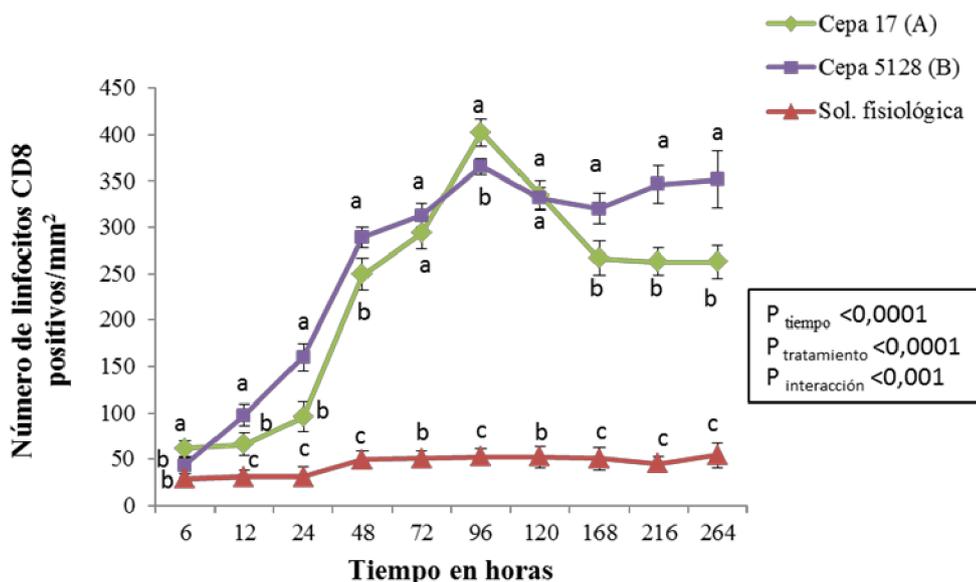


Figura 40: Número de linfocitos CD8 positivos/mm² en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de *S. aureus* y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos. Se muestran los efectos principales del tiempo de muestreo y de los diferentes tratamientos aplicados así como de la interacción entre estos factores. Para cada tiempo (horas), diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Se evaluaron los efectos individuales del tiempo de muestreo, de los tratamientos aplicados y de la interacción entre ambos factores sobre el número de linfocitos CD8 positivos a la inmunomarcación/mm². El número de linfocitos se vio influenciado por los tratamientos aplicados ($P < 0,0001$) y por el tiempo de muestreo ($P < 0,0001$), observándose además interacción entre estos factores ($P < 0,0001$). El número de células inmunopositivas fue mayor en las GM infectadas con las cepas A y B de *S. aureus* con respecto a las inoculadas con solución fisiológica a lo largo de todo el periodo de muestreo ($P < 0,05$).

A las 6 hs pi el número de linfocitos CD8 positivos fue mayor en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus* observándose diferencias con el número de células cuantificadas en las GM inoculadas con la cepa B y con las inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). A partir de las 12 hs pi se observó un aumento gradual en el número de linfocitos CD8 positivos que continuó hasta las 96 hs pi donde se observó un pico en el número de células cuantificadas para ambas cepas evaluadas. A las 12, 24 y 48 hs pi el número de linfocitos CD8 positivos fue mayor en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*, mostrando diferencias con respecto a las GM inoculadas con la

cepa A y con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 72 hs pi el número de linfocitos CD8 positivos permaneció elevado pero no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas inoculadas, pero sí con el control ($P < 0,05$). A las 96 hs pi el número de linfocitos CD8 positivos alcanzó su pico máximo tanto en las GM inoculadas con la cepa A como con la cepa B, observándose diferencias entre éstas y las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). En este periodo el mayor número de linfocitos CD8 positivos se observó en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus*. A las 120 hs pi el número de linfocitos CD8 positivos disminuyó en forma similar para ambas cepas evaluadas difiriendo en forma significativa con el número de células cuantificadas en el grupo control ($P < 0,05$). En los tres últimos periodos evaluados (168 hs, 216 hs y 264 hs pi) el número de linfocitos CD8 positivos/mm² aumentó considerablemente en las GM inoculadas con la cepa B, mostrando diferencias con respecto a las GM inoculadas con la cepa A y con solución fisiológica ($P < 0,05$).

En la Figura 41 se observan cortes histológicos de GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica inmunomarcados con anti CD79 en los cuales se visualizan **linfocitos B**. Las imágenes son representativas y corresponden a uno de los periodos de tiempo evaluados (264 hs pi). La marcación se observó en la membrana celular de los linfocitos B (Figura 41).

En la Figura 42 se muestran las medias y DE del número de linfocitos B inmunomarcados/superficie de área para los diferentes tratamientos aplicados y en los diferentes tiempos pi.

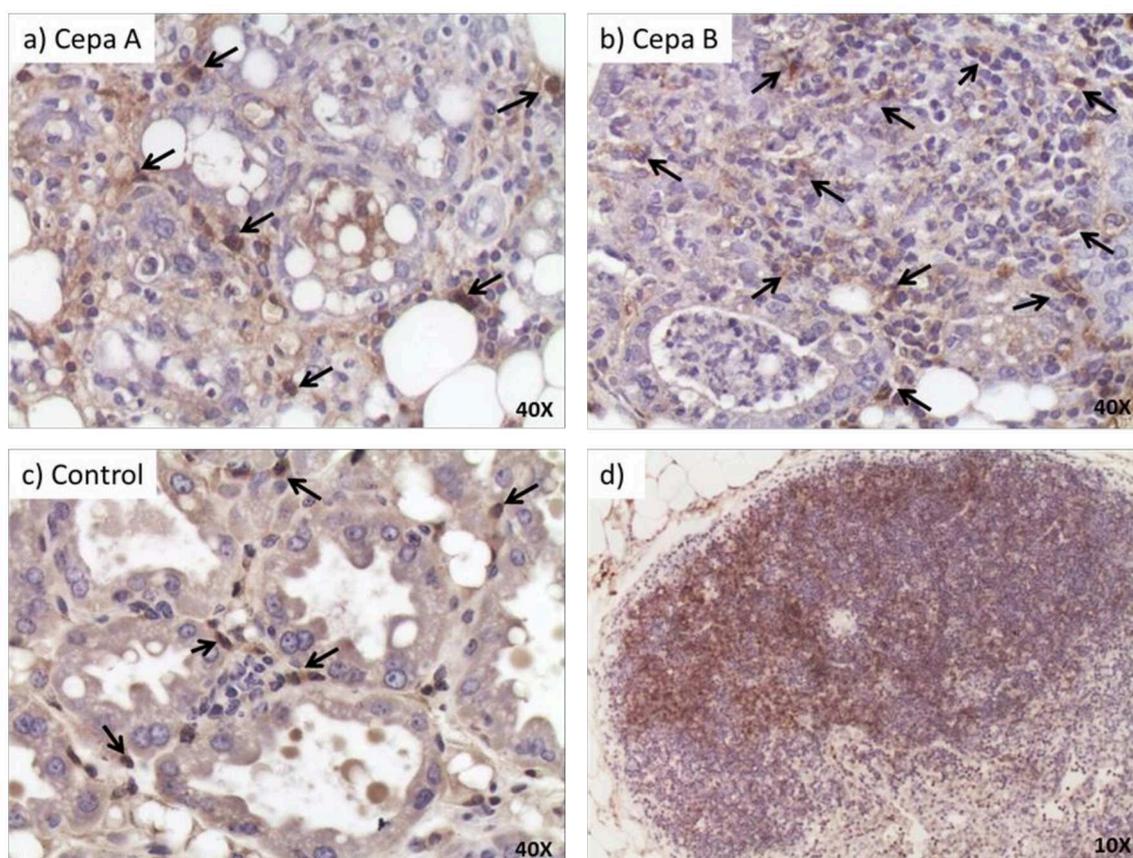


Figura 41: Inmunomarcación de linfocitos B con anti CD79 en glándula mamaria murina (264 hs post inoculación.) Las flechas muestran linfocitos reactivos al cromógeno utilizado. (a) Glándula mamaria inoculada con la cepa A de *S. aureus*. (b) Glándula mamaria inoculada con la cepa B de *S. aureus*. (c) Glándula mamaria inoculada con solución fisiológica (control). (d) Nódulo linfoide mamario obtenido a las 264 hs luego de la inoculación de la glándula mamaria con la cepa B de *S. aureus* donde se observa una gran densidad de linfocitos B inmunomarcados distribuidos principalmente en la zona externa (corteza).

Se evaluaron los efectos individuales del tiempo de muestreo, de los tratamientos aplicados y de la interacción entre ambos factores sobre el número de linfocitos CD79 positivos a la inmunomarcación/mm². El número de linfocitos B se vio influenciado por los tratamientos aplicados ($P < 0,0001$) y por el tiempo de muestreo ($P < 0,0001$), observándose además interacción entre estos factores ($P < 0,0001$). El número de células inmunopositivas fue mayor en las GM infectadas con las cepas A y B de *S. aureus* con respecto a las inoculadas con solución fisiológica a lo largo de todo el periodo de muestreo ($P < 0,05$).

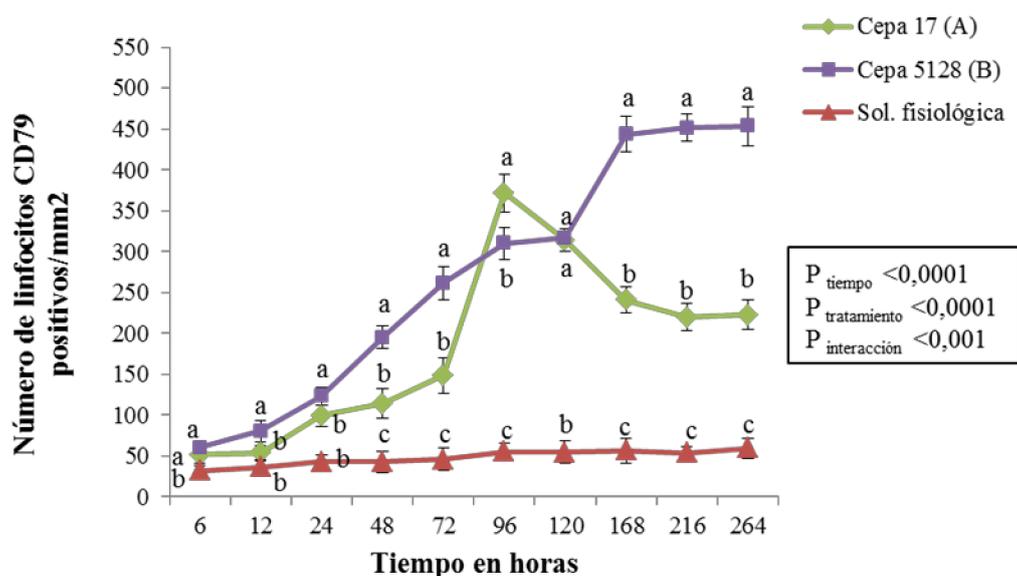
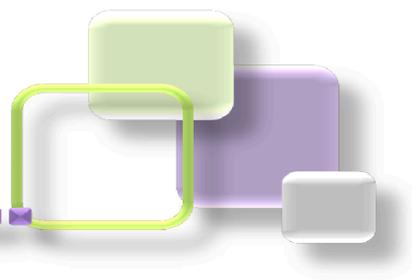


Figura 42: Número de linfocitos B CD79 positivos/mm² en tejido mamario murino luego de la inoculación de 1×10^6 UFC/glándula de las cepas A (17) y B (5128) de *S. aureus* y de solución fisiológica (grupo control) en diferentes tiempos. Se muestran los efectos principales del tiempo de muestreo y de los diferentes tratamientos aplicados así como de la interacción entre estos factores. Para cada tiempo (horas), diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

A las 6 hs pi, el número de linfocitos B CD79 positivos a la inmunomarcación/unidad de área fue similar en las GM inoculadas con la cepa A y B de *S. aureus* mostrando diferencias con el número de linfocitos cuantificados en las GM inoculadas con solución fisiológica donde fue menor ($P < 0,05$). A las 12 hs y 24 hs pi el número de linfocitos B fue en aumento, observándose el mayor número de células inmunomarcadas en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus* mostrando diferencias significativas con respecto al número de linfocitos cuantificados luego de la inoculación de la cepa A y de solución fisiológica donde los números fueron similares ($P < 0,05$). A las 48 y 72 hs pi el número de linfocitos B continuó incrementándose alcanzando los mayores números en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*, mostrando diferencias significativas con respecto a las GM inoculadas con la cepa A y a las inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 96 hs pi, a diferencia del periodo anterior, el número de linfocitos B fue mayor en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus* con respecto a la cepa B, alcanzando un pico y mostrando diferencias significativas entre ellas y con las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). A las 120 hs pi se observó una disminución brusca en el recuento de linfocitos B en las

GM inoculadas con la cepa A, alcanzando números similares a los observados con la cepa B, pero ambos fueron mayores a los cuantificados en las GM inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$). En los tres últimos períodos evaluados (168 hs, 216 hs, 264 hs) se observaron diferencias significativas en el número de linfocitos B entre las GM inoculadas con la cepa A, la cepa B y las inoculadas con solución fisiológica ($P < 0,05$), donde los mayores números de linfocitos B cuantificados se observaron en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*.

5. DISCUSIÓN



5. 1. Selección de las cepas de *S. aureus*

5.1.1. Caracterización fenotípica de las cepas de *S. aureus*

Para el desarrollo y cumplimiento del objetivo general, de un total de 300 aislamientos de *S. aureus* provenientes de diferentes provincias de Argentina, se seleccionaron 36 cepas en base a criterios clínicos, epidemiológicos, RCS promedio del tambo y respuesta a un tratamiento antibiótico estandarizado. Las cepas de *S. aureus* seleccionadas fueron aisladas a partir de leche de bovinos con IIM clínicas y subclínicas y procedían de diferentes tambos de las provincias de Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba.

Para la caracterización de los aislamientos se realizaron diferentes pruebas fenotípicas que permitieron inferir la capacidad de expresar varios factores de virulencia potencialmente relacionados con la patogenia de la mastitis.

La mayoría de las cepas de *S. aureus* de origen bovino procedentes de IIM producen α - y β -toxinas o hemolisinas (Sutra y Poutrel, 1994; Larsen y col., 2002). En el presente estudio, todas las cepas presentaron capacidad de producir hemólisis, donde la mayoría de las cepas presentaron hemolisinas α (91,66%). La α -hemolisina es una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamífero, particularmente eritrocitos; su función principal es convertir el tejido del huésped en nutrientes para la bacteria que la expresa (Dinges y col., 2000). La toxicidad celular se alcanza rápidamente debido a que ocasiona la destrucción de la membrana plasmática, la pérdida de iones celulares y la liberación de compuestos tóxicos a través de los poros (Prince y col., 2012).

La α -toxina de *S. aureus* fue descrita como un factor clave en la supervivencia intracelular del patógeno. Mestre y col. (2010) incubaron células CHO con α -toxina purificada, o las infectaron con una cepa salvaje de *S. aureus*, con una mutante en el gen *hla* o con una mutante complementada con un plásmido codificante de la toxina. Los resultados obtenidos indicaron que, si bien la α -toxina participa en la activación de la vía autofágica, dicha respuesta no fue funcional, ya que no finalizó con la degradación lisosomal. Además, observaron que luego de 4 hs de infección con las cepas productoras de α -toxina, una mayor cantidad de bacterias escapaban de la vesícula del fagosoma, e incluso presentaban signos de división celular, mientras que las bacterias mutantes permanecieron en las vesículas y no presentaron signos de replicación.

Existen resultados discordantes en cuanto a la prevalencia de cepas productoras de α -toxina entre *S. aureus* aislados de mastitis bovinas. En un estudio en el cual se serotipificaron 262 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas en EE. UU., el 94,3 % resultaron positivas para α -toxina (Kenny y col., 1992). Sin embargo, en un estudio posterior realizado en Dinamarca con 105 cepas de *S. aureus*, se observó que si bien el 100 % de ellas presentaban el gen *hla*, solo el 37 % produjeron la toxina *in vitro* (Aarestrup y col., 1999). En el presente estudio, el 100% de las cepas aisladas de IIM clínicas mostraron producción de α -toxina, mientras que de las cepas aisladas de IIM subclínicas el 85,71% presentaron esta capacidad.

La producción de β -hemolisina se observó en un 88,88% de los aislamientos evaluados coincidiendo con otros estudios que muestran que la mayoría de los aislamientos procedentes de IIM bovinas expresan β -hemolisinas (Franco y col., 2008) dañando membranas ricas en esfingomielina. La lisis celular provee a *S. aureus* de nutrientes promoviendo la diseminación de la infección (Foster, 1995; Huseby y col; 2007). En el presente estudio del total de cepas productoras de β -toxina (32), solo tres cepas (9,37%) procedentes de IIM subclínicas, no mostraron capacidad para producir la toxina α .

Estudios previos han demostrado asociaciones entre la expresión de β -toxina y la obtención de mayores recuentos bacterianos, mayor severidad de la sintomatología clínica y mayor capacidad de adherencia a células epiteliales mamarias en modelos experimentales (Bramley y col., 1989; Calvino y col., 1993; Cifrian y col., 1996a). Este último efecto sería producto de la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana plasmática, conduciendo a un incremento de la permeabilidad celular (Low y Feer, 1977). Además, la expresión de β -toxina estaría relacionada tanto con el escape de *S. aureus* al citoplasma mediante la ruptura de la membrana del endosoma, como en la apoptosis celular y daño tisular (Shompole y col., 2003).

En el presente estudio, de las cepas procedentes de IIM clínicas, el 80% presentó la capacidad de producir ambas hemolisinas (α y β) y el 20% restante presentó solo la capacidad de producir α -hemolisina. De las cepas procedentes de IIM subclínicas, el 85,71% presentó capacidad para producir ambas hemolisinas (α y β) y el 14,28% solo mostró capacidad para producir β -hemolisina. A partir de los resultados obtenidos, la producción de las hemolisinas α o β por parte de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas fue considerada como un criterio de diferenciación para la selección de las cepas a inocular en la GM de ratón.

La habilidad de *S. aureus* de formar biofilm in vivo se considera uno de los principales factores de virulencia que influyen en la patogenia de la mastitis, posibilitando una mejor colonización de las células del hospedador y persistencia en el tejido mamario (Arslan y col., 2007). En el presente estudio, la determinación cuantitativa de la capacidad de formación de biofilm por parte de las cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas se realizó mediante cultivo en placa de poliestireno y tinción con cristal violeta. El 100% de los aislamientos analizados procedentes de IIM clínicas y subclínicas mostró capacidad para producir biofilm. La producción de biofilm varió de débil a fuerte en las cepas procedentes de IIM clínicas, no así en las cepas procedentes de IIM subclínicas donde la producción de biofilm varió de moderada a fuerte, no observándose cepas débilmente productoras de biofilm. Sólo el 13% de las cepas procedentes de IIM clínicas mostró capacidad débil para formar biofilm, coincidiendo con los valores obtenidos por Felipe y col. (2013) de 8,66%, pero en desacuerdo con otros estudios (Peña y Uffo, 2013; Bardiau y col., 2014) en los cuales se reportaron porcentajes más elevados. El 40% y 41,66% de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas, respectivamente, mostraron capacidad moderada para producir biofilm, siendo porcentajes superiores a los obtenidos por Peña y Uffo. (2013). Por otra parte, el 46,6% y 58,33% de las cepas provenientes de IIM clínicas y subclínicas, respectivamente, mostraron capacidad fuerte para producir biofilm, porcentajes similares a los obtenidos por Peña y Uffo. (2013).

En un trabajo reciente, y en concordancia con los hallazgos de esta tesis, sobre un total de 215 cepas de *S. aureus* aisladas de 15 tambos comerciales de Córdoba y Buenos Aires (Argentina), se observó que el total de los aislamientos de *S. aureus* analizados demostraron capacidad de formación de biofilm. En los aislamientos provenientes de bovinos con mastitis subclínica los autores reportaron: 8/79 (10,12%) débiles, 25/79 (31,64%) moderados y 46/79 (58,22%) fuertes formadores de biofilms; en los aislamientos de casos clínicos encontraron: 11/127 (8,66%) débiles, 48/127 (37,79%) moderados y 68/127 (53,54%) fuertes formadores de biofilms y para los aislamientos de infecciones crónicas observaron: 1/9 (11,11%) débiles, 2/9 (22,22%) moderados y 6/9 (66,66%) fuertes formadores de biofilms (Felipe y col., 2013).

En nuestro trabajo no se encontraron cepas no productoras de biofilm, aunque en trabajos recientes se encontraron en bajos porcentajes (17,5%), de un total de 229 aislados de *S. aureus* de bovinos, a partir de los casos de mastitis bovina en diferentes áreas de Walonia (sur de Bélgica) (Bardiau y col., 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesis, en concordancia con los de otros autores (Peña y Uffo, 2013; Felipe y col., 2013; Bardiau y col., 2014) demuestran que la capacidad fenotípica de formación de biofilm por *S. aureus* proveniente de IIM en bovinos varía según el tipo de infección establecida. Asimismo, las vías regulatorias para la formación de biofilm varían entre cepas (Melchior y col., 2006), por lo que resulta interesante conocer si las diferencias de expresión resultante entre cepas se pueden atribuir a diferentes genotipos. En el presente estudio, las cepas procedentes de IIM clínicas débilmente productoras de biofilm, mostraron genotipos diferentes según la evaluación realizada por PFGE. Del total de cepas que presentaron capacidad moderada para formar biofilm, el 50% presentó el mismo genotipo y el 50% restante fueron genéticamente diferentes, lo mismo sucedió con las cepas fuertemente productoras de biofilm donde el 50 % perteneció al mismo genotipo y el 50 % restante presentó diferente genotipo. En relación a las cepas procedentes de IIM subclínicas, el 100% de las que presentaron capacidad moderada y fuerte para formar biofilm pertenecieron a genotipos diferentes. En base a estos resultados, no fue posible establecer asociaciones entre la capacidad de formar biofilm por parte de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas con un genotipo particular; por otra parte, el limitado número de cepas evaluadas no permite extraer conclusiones.

5.1.2 Caracterización molecular de los aislamientos de *S. aureus*

Hasta la fecha se han publicado diferentes tipos de primers para la amplificación de una región del genoma del *S. aureus*. En la búsqueda de realizar diagnósticos más rápidos con alta sensibilidad y especificidad, Cremonesi y col. (2006), así como otros investigadores (Aarestrup y col., 1995; Vieira-da-Motta y col., 2001; Yugueros y col., 2001; Reinoso y col., 2007), han propuesto el uso de la PCR para identificación de la bacteria, en cuestión de hs. En un trabajo reciente, Restrepo y col. (2012) demostraron que los primers utilizados en trabajos previos por otros autores como los de Aarestrup y col. (1995) y los de Vieira-da-Motta y col. (2001), no lograron amplificar ninguna muestra de *S. aureus*. Asimismo, el trabajo de Restrepo y col. (2012) demostró que si bien los primers propuestos por Cremonesi y col. (2006), F 5'AGCTGTGGATTGTCCTTTGG3' y R 5'TCGCTCGCTCACCTTAGAA3' para obtener un amplificado de 499 pb, lograron amplificar todas las cepas de *S. aureus*, también amplificaron otras especies como *S. epidermidis*, *S. lungdunensis*, *S.*

pseudointermedius a partir de muestras clínicas. Es posible que la inespecificidad de la prueba, como lo reportan Ramesh y col. (2002), se deba a que los primers se unen inespecíficamente a fragmentos de ADN diferentes al del *S. aureus*, generando falsos positivos.

En el presente trabajo, la identificación genotípica de especie se llevó a cabo por PCR mediante la amplificación de un fragmento especie-específico utilizando los primers descritos por Martineau y col. (1998) donde se identificaron como *S. aureus* la totalidad (100%) de los aislados procedentes de IIM clínicas y subclínicas. Los primers utilizados, según lo descrito por Martineau y col. (1998), confirmaron ser específicos de *S. aureus*.

5.1.2.1. Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes

Estudios previos han demostrado la asociación entre genotipos y factores de virulencia de *S. aureus* con las manifestaciones clínicas y comportamiento epidemiológico de las IIM causadas por esta bacteria, que ponen en perspectiva atributos que favorecerían la persistencia de las infecciones mamarias (Haveri y col., 2007; 2008; Fournier y col., 2008; Piccinini y col., 2010; 2012). Por lo cual, se ha teorizado que las interacciones entre los factores de virulencia del microorganismo, el sistema inmune del hospedador y factores ambientales podrían modular el progreso o resolución de la IIM (Piccinini y col., 2012).

En estudios previos sobre IIM se ha observado que las cepas de *S. aureus* que causan infecciones persistentes difieren de las que causan infecciones transitorias. Estas diferencias entre cepas fueron estudiadas usando técnicas de tipificación molecular descriptivas (Haveri y col., 2007; 2008; Fournier y col., 2008; Graber y col., 2009; Ote y col., 2011), encontrándose además, diferencias funcionales en ensayos in vitro. Estos ensayos funcionales incluyeron adhesión e invasión a las CEM (Tuchscher y col., 2005; Buzzola y col., 2007; Bardiau y col., 2014) y dinámica del crecimiento bacteriano en macrófagos mamarios (Lewandowska-Sabat y col., 2013). Por su parte, Schukken y col. (2011) sugieren que la adaptación de las cepas dominantes al hospedador daría lugar a infecciones asociadas con patrones de enfermedad clínicamente menos severa y mayor oportunidad de permanencia y transmisión en el rodeo. Dado que diferentes cepas de *S. aureus* utilizan estrategias de infección y supervivencia únicas, se ha

teorizado que la respuesta inmune del hospedador también variará de acuerdo con la cepa infectante (Kim y col., 2011).

Los sistemas de tipificación molecular constituyen uno de los aportes microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen por objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De este modo se puede conocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente, y por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común. En el presente estudio, luego de la caracterización fenotípica y genética de especie, se realizó la tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsantes (PFGE). Esta técnica ha sido aceptada como una técnica "estándar de oro" altamente discriminatoria y sensible para distinguir cepas de *S. aureus* (Montesino y col., 2002; Ciftci y col., 2009). La PFGE es un método fiable y reproducible con alto poder discriminatorio que permite distinguir a través del análisis de ADN genómico si un grupo de aislamientos corresponden a una misma variante clonal (Tenover y col., 1995). Esta metodología combina la macrorestricción del ADN genómico y la posterior separación de los fragmentos en un gel de agarosa, generándose patrones de restricción que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movibilidades electroforéticas distintas (Tenover y col., 1995).

Estudios epidemiológicos moleculares sobre aislamientos de *S. aureus* bovinos han demostrado que un gran número de tipos están implicados en la etiología de la mastitis en todo el mundo y que ciertos tipos parecen predominar dentro de regiones geográficas (Capurro y col., 2010; Hwang y col., 2010; Klein y col., 2012; Lundberg y col., 2014). La mayoría de los estudios epidemiológicos moleculares sobre aislados bovinos de *S. aureus* se han realizado en Europa o América del Norte, mientras que los datos procedentes de América del Sur y Argentina son escasos (Sordelli y col., 2000; Buzzola y col., 2001; 2007; Reinoso y col., 2008; Klein y col., 2012). En Argentina, en la década del 90 se realizaron estudios epidemiológicos que revelaron la existencia de unos pocos clones de *S. aureus* responsables de la mayoría de los casos de mastitis (Sordelli y col., 2000; Buzzola y col., 2001). Sin embargo, los datos aportados por estos trabajos son limitados, debido al bajo número de aislados analizados y a su distribución regional, ya que más del 70 % de los aislamientos pertenecía a la misma provincia, mientras que solamente el 4,6 % provenía de las dos provincias que concentran aproximadamente el 60 % de la producción lechera del país.

En el presente estudio, se analizaron 15 cepas procedentes de IIM clínicas y 21 cepas procedentes de IIM subclínicas procedentes de las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, demostrando la existencia de una gran variabilidad genética entre los aislados de *S. aureus* analizados. La tipificación por PFGE de las 15 cepas provenientes de IIM clínicas, discriminó 8 pulsotipos o grupos; mientras que la tipificación de las 21 cepas provenientes de IIM subclínicas discriminó 12 pulsotipos o grupos. Estos hallazgos se relacionan con resultados obtenidos por otros autores en los cuales se informa alta variabilidad genética entre cepas de *S. aureus* procedentes de IIM bovinas (Capurro y col., 2010; Lundberg y col., 2014). Capurro y col. (2010) sobre un total de 82 aislados de *S. aureus* procedentes de casos de mastitis clínica de diferentes regiones de Suecia, obtuvieron 25 pulsotipos, donde el pulsotipo más común fue encontrado en el 26% de los aislamientos y distribuido en todas las regiones evaluadas.

Lundberg y col. (2014) sobre un total de 185 aislamientos de *S. aureus* provenientes IIM clínicas en Suecia, obtuvieron 29 pulsotipos, donde dos pulsotipos fueron clasificados como comunes y encontrados en el 64% de los casos de IIM clínicas. En el presente estudio, el dendrograma obtenido a partir de las 20 cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas mostró que el pulsotipo asignado con la letra F agrupó el mayor número de cepas (7) por lo tanto fue el pulsotipo más común o predominante, representando el 35% de las cepas evaluadas. Además, estuvo representado exclusivamente por aislados procedentes de IIM clínicas. Cuatro de las 7 cepas con características clonales similares pertenecían a diferentes tambos y localidades de la provincia de Córdoba y 3 a diferentes tambos y localidades de la provincia de Santa Fe, lo cual indicaría una amplia distribución regional de los clones mencionados.

La realización de los dendrogramas y obtención de los diferentes genotipos permitió la selección de 9 cepas agrupadas en diferentes pulsotipos para la realización de los ensayos in vitro en las células epiteliales mamarias bovinas y posteriormente los ensayos in vivo en el modelo murino de infección experimental.

En base a los resultados encontrados en este trabajo y a resultados previos obtenidos por otros autores, la diversidad genética de las cepas debería ser considerada dentro de las estrategias de control de la mastitis bovina. Al respecto, sería necesario realizar evaluaciones en las diferentes regiones lecheras de Argentina que permitan detectar los patrones de diversidad de los aislados y establecer diferencias regionales.

5.1.3. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

El porcentaje de *S. aureus* resistente a los antimicrobianos fue bajo, no encontrándose ninguna cepa multiresistente. En este estudio, del total de cepas evaluadas procedentes de IIM clínicas y subclínicas (27 cepas), solo se identificaron 7 cepas resistentes a penicilina (25,92%). De las 7 cepas resistentes 5 procedían de IIM clínicas y 2 de IIM subclínicas. El objetivo de hacer pruebas de resistencia a antimicrobianos no fue realizar comparaciones con estudios específicos, sino utilizarlos para la selección de cepas ya que trabajos previos han demostrado que cepas de *S. aureus* penicilino-resistentes respondían pobremente al tratamiento con otros antibióticos y que la capacidad de resistir a la penicilina podría estar asociada con otras características de las cepas predominantes en un rodeo o área geográfica (Pyörälä y Pyörälä , 1998; Taponen y col., 2003). El mecanismo que explica la asociación entre resistencia a β -lactámicos y pobre respuesta a tratamientos con otros antimicrobianos no β -lactámicos se desconoce. Según Barkema y col. (2006) en su revisión, la explicación más probable es que los genes que codifican para la resistencia a penicilina están localizados en islas de patogenicidad (Gill y col., 2005). Además de los genes de resistencia, las islas de patogenicidad pueden albergar otros genes de virulencia; como los que codifican para la producción de biofilm (Ubeda y col., 2003; Holden y col., 2004). Por lo tanto, la resistencia a penicilina podría ser un indicador de la presencia de islas de patogenicidad que contienen otros genes que contribuyen a la capacidad de la bacteria para sobrevivir al tratamiento antimicrobiano.

La producción de β -lactamasa se considera el mecanismo más frecuente de resistencia a la penicilina entre aislados de *S. aureus* procedentes de IMI bovinas (Watts y Salmon, 1997; Haveri y col., 2005, Olsen y col., 2006). En nuestros ensayos la producción de β -lactamasa fue positiva para los 7 aislados que mostraron resistencia a penicilinas de acuerdo con el método de la cefalosporina cromogénica.

5.2. Evaluación de la presencia de genes relacionados con adherencia, formación de biofilm, polisacáridos capsulares y resistencia a penicilina en el genoma de *S. aureus*

Luego de la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas procedentes de IIM clínicas y subclínicas se evaluó la presencia de genes de virulencia a partir de ADN genómico de los aislados de *S. aureus* seleccionados.

Cabe mencionar que en Argentina existen escasos estudios que aporten datos sobre prevalencia de genes relacionados con adherencia, formación de biofilm, cápsula y resistencia a penicilina en cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas en bovinos (Buzzola y col., 2001; 2007; Reinoso y col., 2008, Camussone y col., 2012; Felipe y col., 2013).

Trabajos anteriores han demostrado que las proteínas de unión a fibrinógeno, o factores de agregación (Clumping factor, Clf), se encuentran presentes en la mayoría de las cepas de *S. aureus* humanas y bovinas (Ote y col., 2011; Klein y col., 2012). Se han descrito dos factores de agregación, ClfA y ClfB, los cuales poseen propiedades anti-fagocíticas y su interacción con el fibrinógeno plasmático resulta en una aglomeración instantánea de las células bacterianas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo han mostrado similitudes y unas pocas diferencias con otras investigaciones. El gen *clfA* presentó una prevalencia del 92,5%, frente a valores mucho menores presentados en otros trabajos, 25% (Tang y col., 2013) y 50,6% (Klein y col., 2012), y otros ligeramente mayores, 96,9% (Ote y col., 2011) y 98% (Peacock y col., 2002). En lo que respecta a *clfB*, se identificó en la totalidad de las cepas (100%), lo que en general se condice con otros trabajos (Peacock y col., 2002; Ote y col., 2011; Klein y col., 2012; Tang y col., 2013).

El gen *fnbA* se identificó en un porcentaje ligeramente mayor (96,30%) que en otros estudios (Peacock y col., 2002; Ote y col., 2011; Tang y col., 2013); asimismo la prevalencia de *fnbB* (97,5%) también resultó mayor que en otros trabajos reportados (Klein y col., 2012; Tang y col., 2013). Al igual que en el caso de genes *clf*, todas las muestras analizadas mostraron la presencia de al menos uno de estos dos genes.

El locus *ica*, está compuesto por los genes *icaADBC* y entre ellos, *icaA* e *icaD* han mostrado un rol importante en la formación de biofilm en *S. aureus* y *S. epidermidis* (Götz, 2002). Se ha informado la presencia del locus *ica* en la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina, indicando un rol potencial como factor de virulencia en la patogenia de la mastitis en rumiantes (Vasudevan y col., 2003; Cucarella y col., 2004). En general, el locus *ica* mostró prevalencia elevada y uniforme; observándose para *icaADC* 96,3%, 100% y 96,3%, respectivamente. Se ha demostrado que esta tendencia se mantiene en la mayoría de los estudios realizados, excepto algún caso

puntual en el que la prevalencia específica de *icaA* no alcanzó 60% (Chavhan y col., 2012). En un trabajo reciente, donde se evaluó la prevalencia de genes relacionados con formación de biofilm en 215 cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas, subclínicas y crónicas, aisladas de 15 tambos de las provincias de Córdoba y Buenos Aires (Argentina), detectaron la presencia de los genes *icaA* e *icaD* en 53/79 (67,08%) de los aislamientos provenientes de IIM subclínicas; mientras que en los aislamientos provenientes de casos clínicos (127) y crónicos (9) el 100% de las cepas mostraron ambos genes.

Al igual que el locus de adhesión intercelular, el gen *bap* se encuentra involucrado en la formación de biofilms, sin embargo, éste no se detectó en ninguna de las cepas evaluadas coincidiendo con lo reportado en otros trabajos (Cucarella y col., 2001; Melchior y col., 2009; Tang y col., 2013; Szweda y col., 2012). No obstante, en concordancia con nuestros resultados, en un trabajo donde se estudió la presencia del gen *bap* en aislados humanos (n=75) y bovinos (n=350) de *S. aureus*, éste solo pudo ser detectado en el 5% de los aislados de origen bovino y en ninguno de origen humano (Cucarella y col., 2001). Estos resultados continúan sustentando las hipótesis planteadas que indicarían que el gen *bap* no se encuentra ampliamente diseminado entre aislados de origen humano y animal (Vautor y col., 2008; Szweda, y col., 2012).

En los estudios realizados por Felipe y col. (2013) a partir de cepas procedentes de diferentes tambos de las provincias de Córdoba y Buenos Aires (Argentina), detectaron la presencia del gen *bap* en 3/79 (3,79%) y 24/79 (30,37%) de los aislados procedentes de IIM subclínicas y clínicas, respectivamente; mientras que en los aislados procedentes de IIM crónicas encontraron un 100% (9/9) de prevalencia del gen *bap* (Felipe y col., 2013).

Respecto al gen *cna*, éste se identificó solo en el 18,51% de los aislados mientras que en otros trabajos se detectó en el doble de los casos (Peacock y col., 2002; Ote y col., 2011; Klein y col., 2012). Son escasas las investigaciones abordadas acerca del gen *fib*, aun así los resultados coinciden con los que aquí se obtuvieron con un valor de prevalencia de 97,5% (Tang y col., 2013).

Staphylococcus aureus produce PC in vitro en condiciones definidas de cultivo (Sutra y col., 1990), los cuales también han sido detectados in vivo durante IIM experimentales agudas y crónicas (Hensen y col., 2000). Se ha demostrado que los PC confieren resistencia a la fagocitosis por PMN bovinos (Sutra y col., 1990), y esta es considerada la principal línea de defensa de la GM frente a patógenos invasores (Paape

y col., 2002). Los anticuerpos dirigidos contra los PC tienen un efecto protector, ya que son capaces de opsonizar cepas capsuladas de *S. aureus* y favorecer así la fagocitosis por PMN (Sutra y col., 1990). Por estas características las cepas productoras de PC han sido incorporadas en inmunógenos para la generación de respuestas protectoras y su importancia ha sido resaltada en los últimos años en varios estudios (Gilbert y col., 1994; Han y col., 2000; Han y Park, 2000; Tollersrud y col., 2001; Camussone y col., 2013; Renna y col., 2014).

El hallazgo de que la ausencia o reducción en la expresión de PC aumentó la adherencia de *S. aureus* a células endoteliales (Pohlmann-Dietze y col., 2000) e invasión a las CEM bovinas *in vitro* (Buzzola y col., 2007; Thurlow y col., 2011; Bardiau y col., 2014), ha resaltado la importancia de los PC en la internalización dentro de las células del hospedador.

Los aislamientos de *S. aureus* de rumiantes, muestran cierta variabilidad respecto de la distribución de los PC. Un estudio realizado en Argentina determinó que solo el 14% de 195 aislamientos de leche bovina fueron caracterizados como serotipos PC5 o PC8 (Sordelli y col., 2000). Sin embargo, más del 70% de los aislamientos pertenecían a la misma provincia, mientras que solamente el 4,6% provenían de las 2 provincias que concentran aproximadamente el 60% de la producción lechera del país. En un estudio posterior que incluyó 15 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en distintos rodeos lecheros de la provincia de Buenos Aires, 7 fueron caracterizadas por métodos genotípicos como tipo cap5, mientras que ninguna como tipo cap8 (Reinoso y col., 2008). En otro estudio reciente Camussone y col. (2012) evaluaron por PCR la presencia de los locus capsulares cap5 y cap8 en 157 aislados de *S. aureus* procedentes de mastitis clínicas y subclínicas; pertenecientes a las provincias de Santa Fe (n=91), Buenos Aires (n=31), Córdoba (n=22) y Entre Ríos (n=13). El 64% de los aislamientos pudo genotipificarse; resultando el 53% cap5 y el 11% cap8. Además, al evaluar fenotípicamente la presencia de CP, se observó que el 50% de los aislados con genotipo cap5 o cap8, eran capaces de producirlo *in vitro* (Camussone y col., 2012). La caracterización genotípica es altamente significativa debido a que varios factores involucrados en la expresión de cápsula no han sido completamente definidos, y su expresión *in vivo* no se correlaciona necesariamente con la expresión bajo condiciones *in vitro* (O'Riordan y Lee, 2004).

En nuestro estudio, los genes cap5 y cap8 se detectaron en el 85,18% de las cepas evaluadas, correspondiendo 55,55% a cap5, 29,64% a cap8 y 14,81% fueron cepas que

no amplificaron cap5 ni cap8 y se definieron como NT. El 46,66% de las cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas presentó el gen cap5, mientras que el 33,33% presentó el gen cap8 y el resto no expresaron ninguno de los genes cap (20%). Con respecto a las cepas procedentes de IIM subclínicas, el 66,66% presentó el gen cap5, el 25% presentó el gen cap8, y el resto de las cepas no expresaron ninguno de los genes cap (8,33%). Tanto en las cepas procedentes de IIM clínicas como subclínicas el genotipo capsular predominante fue el 5, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Reinoso y col., 2008; Camussone y col., 2012).

La detección del gen blaZ por PCR se considera el método de referencia para detectar resistencia a penicilina, ya que se correlaciona bien con la producción de β -lactamasa (Olsen y col., 2006). Pocos estudios describen la relación entre los métodos genotípicos y fenotípicos para detectar resistencia a la penicilina en aislados *S. aureus* de IIM bovinas.

En el presente estudio, el 100% de las cepas de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas que mostraron ser resistentes a penicilina por pruebas de inhibición y mostraron producción de β -lactamasa, presentaron el gen blaZ. El gen blaZ (portado por un plásmido) codifica para la síntesis de β -lactamasa de *Staphylococcus*, enzima responsable de la degradación del anillo betalactámico de las penicilinas (Brakstad y Maeland, 1997). En publicaciones previas se ha documentado que la presencia del locus blaZ influye negativamente el resultado de la terapia antibiótica conduciendo a un mayor riesgo de IIM persistentes (Haveri y col., 2007). En este sentido, Haveri y col. (2007) demostraron una asociación significativa entre la presencia del gen blaZ en cepas de *S. aureus* procedentes de IIM crónicas y la persistencia de la infección en bovinos. Los resultados del presente estudio no se condicen con los de Haveri y col. (2007) ya que del total de cepas resistentes a penicilina que presentaron el gen blaZ, 5 procedían de IIM clínicas y 2 de IIM crónicas; sin embargo hay que tener en cuenta que el número de cepas de este estudio es limitado para aseverar la no existencia de tal asociación.

5.3. Ensayos de internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T)

Clásicamente, *S. aureus* se ha caracterizado como un patógeno extracelular (Finlay y Cossart, 1997). Sin embargo, un número creciente de estudios ha demostrado

la habilidad de *S. aureus* de invadir y sobrevivir dentro de varios tipos celulares del hospedador, incluyendo CEM, neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000), lo cual contribuye a su persistencia en numerosas enfermedades en animales y seres humanos (Gresham y col., 2000). Estas particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario.

Las células epiteliales que revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos mamarios constituyen en conjunto las primeras células que reconocen a los patógenos y participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Recientemente, en infecciones experimentales con *S. aureus* en GM bovina se demostró que las células epiteliales, en sus diferentes localizaciones, proporcionan una respuesta inmune activa y temprana contra el patógeno, destacando su importancia en la patogenia de las IIM en bovinos (Whelehan y col., 2011). Estudios recientes sugieren que las CEM podrían afectar diferencialmente la respuesta inflamatoria global en función de cómo reconocen y responden a los diferentes PAMP bacterianos (Bougarn y col., 2010; Gilbert y col., 2013).

En el presente estudio, uno de los objetivos específicos planteados fue evaluar *in vitro* en una línea de CEM bovinas la capacidad de invasión de cepas de *S. aureus* caracterizadas como de baja adaptación a la GM bovina y de alta adaptación a la GM bovina, seleccionadas en base a criterios clínicos, fenotípicos y genéticos para poder establecer diferencias entre las mismas.

Respecto a los ensayos de invasión celular, se pudo observar una gran variabilidad en los resultados. Por un lado, se destacó la gran capacidad invasiva de la cepa 5011 aislada de una IIM subclínica caracterizada por su alta adaptabilidad a la GM, seguida de la cepa 17 aislada de IIM clínica, considerada de baja adaptabilidad a la GM bovina. Por otra parte, con porcentajes de internalización medios se encontró la cepa 61 aislada de IIM clínica. El resto de las cepas, mostraron porcentajes de internalización significativamente menores y estuvieron representadas por 3 cepas procedentes de IIM clínicas y 3 cepas procedentes de IIM crónicas. Estos resultados demostraron que la capacidad de invasión a las CEM bovinas no estuvo asociada con la manifestación clínica de la IIM mostrando tanto cepas procedentes de IIM clínicas como subclínicas (crónicas) capacidades invasivas diferentes.

En el presente estudio, no se encontró una relación general entre los mayores porcentajes de internalización con la sobre-expresión de los genes de adherencia y formación de biofilm. Esto se ve reflejado en el aislado 358, que tuvo la menor capacidad invasiva pero sobre-expresó la totalidad de los genes estudiados, inclusive algunos como el *icaD*, con una expresión muy superior a la de los demás aislados. En contraposición, el aislado 5011 que mostró la mayor capacidad invasiva, sobre-expresó tanto los genes relacionados con adherencia e internalización como los relacionados con la habilidad de producir biofilm. Sumado a lo anterior, los aislados 358 y 5011, que mostraron capacidades invasivas significativamente diferentes, presentaron fuerte capacidad para formar biofilm en los ensayos de cultivo en placas de poliestireno. Por lo tanto, estos resultados coinciden con estudios previos, que observaron que la capacidad de producir biofilm por parte de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina no influyó en la capacidad de invasión a las MAC-T (Oliveira y col., 2011).

A su vez, otros trabajos mostraron alta expresión de genes MSCRAMMs e *icaADBC* en aislados poco adherentes y viceversa. Se planteó entonces, que la expresión de estos genes sería particular de cada aislado y no estaría necesariamente asociada a su capacidad de adherencia (Vautor y col., 2009). Una relación que sí se debe resaltar es la elevada internalización del aislado 17 con la aumentada expresión relativa del gen *fnbB*, resultados que consolidan la idea de que estas proteínas [FnBP] serían indispensables para la invasión celular. Incluso, algunos plantearon la hipótesis de que esta proteína sería por sí sola suficiente para la internalización (Dziewanowska y col., 1999). Tal hipótesis se ha podido demostrar a partir de la expresión heteróloga de estas proteínas en cepas bacterianas no invasoras, con la consecuente adquisición de esta capacidad (Massey y col., 2001). Esto también concuerda con el mecanismo de fagocitosis mediado por pseudópodos que plantea la necesidad de interacciones de FnBP con integrinas $\alpha_5\beta_1$ de la célula hospedadora para iniciar una cadena de señalización intracelular mediada por proteínas tipo tirosina quinasas que darían inicio a este proceso (Dziewanowska y col., 1999; Sinha y col., 1999; Fowler y col., 2000). Sin embargo, la falta de una completa correlación entre los niveles de expresión relativa de FnBP-B y los porcentajes de internalización, podría explicarse por la producción bacteriana de otras moléculas extracelulares que afecten la internalización, como cápsula u otros MSCRAMMs, que influirían en la capacidad de invasión de *S. aureus*, independientemente de su capacidad de unirse a fibronectina (Dziewanowska y col., 1999).

Como se mencionó anteriormente, trabajos previos han mostrado asociaciones entre la ausencia de expresión de PC y una mayor capacidad de invasión de *S. aureus* a las CEM bovinas (Buzzola y col., 2007; Thurlow y col., 2011; Bardiau y col., 2014). En el presente estudio, solo una de las cepas que mostró alta capacidad de invasión (5011), aislada de mastitis crónica, no fue portadora de genes *cap*, mientras que las cepas 17 y 61, que también mostraron capacidades invasivas elevadas, fueron portadoras de los genes *cap8* y *cap5*, respectivamente. Todas las cepas que mostraron baja capacidad de invasión a la MAC-T fueron portadoras de genes *cap5* o *cap8*. Un hecho a considerar al realizar interpretaciones de los resultados es que la expresión de los PC5 y 8 es altamente sensible a varias señales del entorno y probablemente esté influenciada por el ambiente (O'Riordan y Lee, 2004). Ciertas condiciones de crecimiento bacteriano, tales como el medio de cultivo, han demostrado tener una influencia muy importante en la producción de la cápsula (Dassy y col., 1991; Poutrel y col., 1995).

Anteriormente, se ha reportado la relación entre el genotipo bacteriano obtenido en ensayos de PFGE y asociaciones específicas de genes de virulencia, con la severidad de los signos clínicos y la persistencia de las IIM (Haveri y col., 2005; Vautor y col., 2009). No obstante, estos grupos han evaluado presencia de genes y no niveles de expresión, destacándose la importancia de este tipo de estudios. En este trabajo, si bien los aislados procedentes de IIM crónicas presentaron diferencias con los aislados de IIM clínicas en cuanto al perfil de expresión génica, éstas no permitieron establecer una relación entre persistencia de IIM y expresión relativa de factores de superficie *in vitro*. A partir de los resultados obtenidos, surge la hipótesis compartida con otros investigadores (Vautor y col., 2009) de que la expresión de los factores de adherencia y de formación de biofilm está intrínsecamente ligada a cada aislado de *S. aureus* y no a la virulencia del microorganismo o a las características de la IIM. Para apoyar esta hipótesis, surge como primera necesidad ampliar la muestra analizada, e incorporar al análisis otros factores inherentes al hospedador y/o a factores medioambientales, que no fueron considerados en los estudios *in vitro*.

5.4. Determinación de la expresión relativa (R) de genes de adherencia y formación de biofilm a partir de cepas de *S. aureus* en el modelo de invasión *in vitro*

Uno de los objetivos específicos de este trabajo de tesis fue estudiar los niveles de expresión de genes de adherencia y formación de biofilm de aislados de *S. aureus*

provenientes de IIM clínicas y crónicas con diferentes características fenotípicas y genotípicas a fin de establecer relaciones con la capacidad invasiva y las características de crecimiento in vitro de cada uno. Esto ayudaría a determinar la existencia de posibles asociaciones entre las distintas variables consideradas y el tipo de infección que desarrollan. Además, aportaría información acerca de la importancia de cada factor de virulencia en el modelo in vitro utilizado.

Dado que la presencia de un gen no garantiza su transcripción, es que en este trabajo se llevó a cabo el estudio de expresión in vitro de 6 de los principales genes de adherencia en los 9 aislados de *S. aureus* de IIM bovinas seleccionados. Cabe destacar que, aunque en los aislados 17, 48 y 61 no se haya detectado la presencia de alguno de ellos -*fnbA*, *clfA*, *fnbB*- aún en repetidas reacciones de amplificación, éstos sí se pudieron detectar en los ensayos de expresión. Posiblemente esto pudo deberse a la diferencia de sensibilidad de las técnicas de amplificación empleadas. Existe amplia bibliografía disponible en la cual se destaca la alta sensibilidad y especificidad de la RT-PCR en tiempo real para amplificar pequeñas cantidades de ARNm y pequeñas variaciones en la expresión de genes en relación a la PCR de punto final (Pfaffl, 2001).

Previo al ensayo de expresión relativa propiamente dicho, se evaluaron tres genes como candidatos housekeeping. Dado los numerosos trabajos reportados sobre el uso como estándar interno del gen que codifica para ARNr 16S bacteriano, se evaluó la presencia del mismo en todas las muestras de ADN estudiadas. Sin embargo, en los geles de agarosa en los que se verificó la amplificación de dicha secuencia, también se visualizaron bandas en los controles negativos. Tratando de eliminar la posible contaminación con ADN bacteriano, se sintetizaron nuevos oligonucleótidos y se renovaron las alícuotas de todos los reactivos, sin poder solucionarse este inconveniente. La extensa búsqueda bibliográfica realizada sobre el uso de este gen como estándar interno para expresión génica en procariotas, mostró que una de las principales causas de amplificación de esta secuencia en blancos de reacción sería la presencia de restos de material genético bacteriano proveniente de la producción de la Taq polimerasa en forma recombinante en plataformas bacterianas. Debido a que el gen codificante de ARNr 16S se encuentra ampliamente distribuido en procariotas, en ausencia de una enzima ultrapura, la implementación del mismo como control interno en técnicas de elevada sensibilidad sigue resultando problemática (Corless y col., 2000). Por otro lado, si bien este gen fue y es aún utilizado como estándar interno (Young-Duck y col., 2007; Klein y col., 2012), nuevas investigaciones demostraron que el nivel

de sus transcritos es demasiado alto respecto al de los demás ARNm, por lo que no resultaría representativo de dicha población; además de presentar un patrón de expresión diferencial (Desroche y col., 2005; Valihrach, 2012) lo que se suma a las desventajas para su uso. Los ensayos realizados con los otros dos genes, mostraron que el mejor comportamiento lo presentó *gyrB*, coincidiendo con otro trabajo publicado (Joseffson y col., 2008; Valihrach, 2012).

En relación a los genes de adherencia, se ha sugerido que *ClfB* se expresa solo durante la fase temprana de crecimiento exponencial y que luego sería degradado de la superficie por proteasas bacterianas (Ní Eidhin y col., 1998), mientras que el *ClfA* estaría presente en todo el ciclo de crecimiento (Hartford y col., 1997). Sin embargo, en un estudio reciente realizado en un modelo murino de bacteriemia e infección de herida con diferentes cepas de *S. aureus* se demostró que la expresión del *ClfA* es heterogénea y dependiente del microambiente de infección y de la cepa utilizada (Nanra y col., 2009). En el presente estudio, respecto a las expresiones de los genes de adherencia, *clfA* mostró sobre-expresión en bacterias internalizadas de algunos de los aislados, siendo 358, 1595 y 5011 los que presentaron valores más altos. No obstante, estos niveles de expresión hallados *in vitro* fueron muy variables entre las cepas, comportamiento similar al observado *in vivo* en modelos de infección murina (Nanra y col., 2009).

Respecto a *clfB*, cuya prevalencia fue del 100%, su expresión varió con cada aislado en particular y en general no estuvo asociada a la manifestación clínica de la IIM. Los aislados 17 y 316 mostraron expresión significativamente disminuida en las bacterias no internalizadas aunque el aislado 316 aumentó significativamente su expresión en la fracción internalizada, así como el aislado 5011, ambos procedentes de IIM crónicas. Los aislados 358 y 48 (procedentes de IIM clínicas), si bien sobre-expresaron en la fracción internalizada, los niveles detectados fueron relativamente bajos. El resto de los aislados no presentaron diferencias en su expresión relativa.

Fue destacable la expresión de los genes de proteínas de unión a fibronectina. El gen *fnbA* estuvo sobre-expresado en las bacterias internalizadas de todos los aislados, con valores R muy elevados, en su mayoría mayores a 40. Para las muestras de bacterias no internalizadas, *fnbA* tuvo una expresión significativamente menor para los aislados 48, 17, 316 y 5011. Por otra parte, *fnbB* tuvo una expresión significativamente menor para los aislados 1595, 316 y 5011 y superior para los aislados 48 y 17, comportamiento que se diferencia del resto de los casos analizados, ya que en general no se observó

sobre-expresión de genes en las muestras de bacterias no internalizadas. Sin embargo, el grupo de bacterias internalizadas mostró sobre-expresión en casi todos los casos, con valores relativamente elevados y una sobreexpresión destacablemente superior de la cepa 17 (R=406,61), inclusive la más elevada de todos los genes analizados.

Analizando en paralelo los resultados obtenidos para *clfB* y los dos genes *fnb*, se observó que en general los aislados tendieron a sobre-expresar más los últimos. Mientras que *clfB* sólo fue sobre-expresado en bacterias internalizadas de algunos aislados en niveles muy variados, los genes codificantes de FnBP fueron sobre-expresados por la mayoría de los aislados, y en niveles muy superiores. Este comportamiento es consistente con el observado por Klein y col. (2012), donde se analizaron 9 aislados de *S. aureus* genotípicamente diferentes e involucrados en IIM de carácter subclínico, encontrándose una expresión de *clfB* siempre inferior a la de *fnbA*.

Por su parte, si bien los genes *icaA* mostraron sobre-expresión en el 55,55% de los aislados en bacterias internalizadas, *icaD* se sobre-expresó en todos, aunque con niveles variados. Cabe destacar que, si bien se ha demostrado que el locus *ica* es indispensable para la formación de biofilm (Cramton y col., 2009) y que éste estaría relacionado con la persistencia del microorganismo (Melchior y col., 2006; Oliveira y col., 2006; Thurlow y col., 2011), de los aislados procedentes de IIM subclínicas o crónicas, dos cepas mostraron sobreexpresión de *icaD*, en niveles relativamente bajos y dos lo hicieron en niveles elevados. De este gen, se puede destacar la sobre-expresión por parte de las cepas 358 (procedente de IIM clínica) y 5011 (procedente de IIM crónica) con valores de R cercanos a 90 y 193, respectivamente.

Realizando un análisis global de las variaciones de la expresión de los genes de adherencia y formación de biofilm, se puede observar una marcada tendencia a verse sobre-expresados en aquellas bacterias que lograron la internalización a células del epitelio mamario bovino, en relación a las que no lo hicieron y se mantuvieron en el sobrenadante de los co-cultivos. Se destaca también que los genes codificantes de FnBPs e *IcaD* han sido los más sobre-expresados. Asimismo, de los resultados se desprende que en general la sobre-expresión de genes de adherencia y formación de biofilm no se asoció con la manifestación clínica de la IIM ni con la capacidad de invasión a la CEM bovina sino que varió con cada aislado en particular.

5.5. Curvas de crecimiento de *S. aureus*

Con el objetivo de aportar al entendimiento de la capacidad invasiva de los aislados en asociación con el perfil de expresión génica y las características particulares de las IIM; se evaluó el comportamiento de cada uno de ellos en su capacidad de multiplicación *in vitro*. En los cultivos en los que se pudo alcanzar la fase estacionaria, la densidad celular máxima obtenida fue del orden de 10^9 UFC/ml, dato que concuerda con hallazgos previos (Wolz y col., 2002), aun cuando entre los mismos se observó una marcada diferencia entre los TD. Los resultados obtenidos permitieron clasificar a los aislados en dos grupos, uno con TD entre 31 y 39 minutos, y otro con TD que variaron entre los 40 y 50 min. Todas las cepas del primer grupo pertenecían a mastitis clínicas, mientras que las del segundo grupo pertenecían a mastitis subclínicas. El análisis estadístico de los TD reveló diferencias significativas entre los grupos, observándose los menores TD en el grupo de bacterias procedentes de IIM clínicas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir de los ensayos de invasión luego de 2 hs de incubación de las diferentes cepas de *S. aureus* en el medio de cultivo de las MAC-T, donde se observó que las cepas procedentes de infecciones IIM clínicas presentaron, en promedio, UFC/ml más elevadas que las cepas procedentes de IIM crónicas mostrando mayor capacidad para multiplicarse en un microambiente propicio para el crecimiento de las de las CEM bovinas. En términos generales, estos resultados indicaron que entre aislados de *S. aureus* provenientes de IIM con diferente manifestación clínica, habría una diferencia en la velocidad de crecimiento. Por otro lado, relacionando los resultados de TD con la capacidad de invasión a la célula epitelial, se desprende que el aislado 17 con alta capacidad invasiva, mostró un TD intermedio-bajo que corresponde a una velocidad de duplicación elevada; mientras que el aislado 5011 que presentó un TD significativamente más elevado que corresponde a una baja velocidad de duplicación, también presentó elevada capacidad invasiva. El aislado 61 que presentó capacidades invasivas elevadas presentó características diferenciales de crecimiento en cultivo líquido y sólido, siendo el desarrollo excesivamente lento y con formación de colonias diminutas, respectivamente. De hecho, debido a estas limitaciones es que no se logró construir la curva de crecimiento para tal muestra.

La conclusión a la que se puede arribar a partir de estos resultados es que distintos aislados de *S. aureus* crecen a diferentes velocidades pero alcanzan la misma densidad celular máxima alrededor de las 5 hs de cultivo. Asimismo, estas diferencias en las velocidades de crecimiento, si bien no mantendrían en general relación con la capacidad invasiva a la CEM, sí estuvieron asociadas con la persistencia de la IIM causada, a

juzgar por los TD alcanzados por los aislados de IIM crónicas, significativamente mayores a los restantes ($P < 0,05$). A partir de estos resultados se podría inferir que aquellas cepas causantes de IIM crónicas, tendrían una velocidad de multiplicación más lenta. Estos hallazgos resultan interesantes debido a la ausencia de trabajos previos donde se haya comparado el comportamiento en el crecimiento bacteriano entre cepas de *S. aureus* de IIM de carácter clínico y subclínico o persistente.

5.6. Persistencia in vivo de las cepas de *S. aureus* y evaluación del daño tisular y reacción inflamatoria

El uso del modelo en ratón es una alternativa relativamente económica que requiere del cuidado estándar y de experiencia básica en el manejo de animales de laboratorio. En la actualidad, este modelo continúa siendo una herramienta adecuada para los trabajos de investigación que se centran en la patogénesis y control de las IIM en bovinos (Broulliette y Malouin, 2005). También beneficioso para el estudio de la mastitis es el hecho de que observaciones en el ratón concernientes a recuentos bacterianos, número de neutrófilos y cambios histológicos son similares a las observadas en bovinos (Chandler, 1970). Estos modelos animales representan un recurso esencial para la generación de nuevos conocimientos sobre mecanismos de enfermedad y constituyen parte imprescindible del puente traslacional entre la investigación básica y su proyección clínica.

En el presente trabajo se logró el desarrollo de un modelo de infección IM en ratón utilizando cepas de *S. aureus* procedentes de mastitis bovina tal como se propuso en uno de los objetivos específicos planteados. Se obtuvieron los recuentos de UFC/glándula a partir de homogeneizados de tejido mamario luego de la inoculación IM de dos cepas diferentes de *S. aureus* (A y B) caracterizadas respecto de su potencial capacidad infecciosa, como de baja adaptación a la GM y alta adaptación a la GM y tendencia a la cronicidad. Para la selección se consideraron parámetros clínicos, epidemiológicos del rodeo de origen, adaptación a la GM bovina según el tiempo de permanencia en el cuarto mamario afectado (baja o alta adaptación), susceptibilidad a los antimicrobianos, producción de enzimas, capacidad de producción de biofilm, capacidad de internalización a la célula epitelial mamaria bovina, prevalencia y expresión relativa de genes de adherencia, capacidad de crecimiento en cultivo, formación de biofilm, cápsula y resistencia a penicilina. Asimismo se tuvo en cuenta

que las cepas inoculadas en la GM de ratón tuvieran diferentes patrones clonales al análisis por PFGE. En base a estos criterios se seleccionaron la cepa A, procedente de IIM clínica y de baja adaptación a la GM bovina de acuerdo a su potencial infeccioso y la cepa B altamente adaptada a la GM bovina, procedente de IIM crónica.

Luego de la inoculación IM por el canal del pezón de las cepas A y B de *S. aureus*, se observó una amplia diseminación de las bacterias en la GM, replicándose eficientemente ya que a las 6 hs pi se obtuvo un elevado recuento bacteriano para ambas cepas. Concuerd a con trabajos realizados con otras bacterias causante de mastitis subclínicas como *Streptococcus agalactiae*, donde luego de la infección de 1×10^8 UFC/glándula las mismas se replicaron eficientemente difundiendo en las GM y en otros órganos sistémicos, lo cual se observó a las 6 hs pi alcanzando un máximo aumento en 100 veces después de 24 hs (Trigo y col., 2009). En el mismo trabajo de Trigo y col. (2009) luego de 24 hs, se observó una fuerte disminución de la carga bacteriana, seguido por una disminución más gradual de 72 a 240 hs, y otro fuerte descenso después de 240 hs. Por lo tanto, el aclaramiento de bacterias comenzó a las 24 hs después de la infección por *S. agalactiae*. En nuestro ensayo la disminución de la carga bacteriana de *S. aureus* para la cepa A comenzó a partir de las 24 hs pi y se mantuvo hasta las 72 hs, luego de este periodo el nivel de infección bacteriana se mantuvo hasta las 264 hs pi no alcanzándose la eliminación de la bacteria del tejido. Por otra parte, la cepa B alcanzó los niveles de infección máximos 24 hs más tarde que la cepa A, a las 48 hs pi para descender en forma gradual hasta las 120 hs pi. Lo llamativo de la cepa B es que a partir de las 120 hs pi el nivel de infección bacteriana comenzó a aumentar en forma gradual hasta alcanzar, a las 264 hs pi valores de UFC/ml máximos y superiores a los registrados a las 48 hs pi. Este comportamiento denotó una reagudización del proceso infeccioso a partir de las 120 hs pi, característico de los procesos infecciosos crónicos que alternan con ciclos de reinfección (revisado por Akers y Nickerson, 2011).

Tuscherr y col. (2005) a los fines de investigar el efecto de la expresión de PC sobre la persistencia de *S. aureus* en la GM, desarrollaron un modelo de IIM en ratón utilizando una cepa de *S. aureus* que expresaba PC5, otra que expresaba PC8 y una cepa que no expresaba cápsula (PC⁻). En este trabajo, luego de la inoculación IM de 1×10^6 UFC/glándula de las tres cepas de *S. aureus*, se observó que la velocidad de eliminación del tejido fue similar para las tres cepas evaluadas hasta los días 4 a 8 pi; mientras que a los 12 días pi, para la cepa PC⁻, la velocidad de eliminación fue significativamente

inferior, logrando su persistencia en el tejido mamario. En el presente estudio, si bien las cepas A y B de *S. aureus* fueron caracterizadas como portadoras de genes *cap8* y *cap5*, respectivamente, no se evaluó la capacidad de las mismas de expresar los PC in vitro por lo cual los resultados obtenidos por Tuchscher y col. (2005) no son los apropiados para realizar asociaciones. Sin embargo, en el presente trabajo, si bien ambas bacterias lograron persistir en la GM murina, la cepa A, portadora de genes *cap8*, mostró una mayor tasa de eliminación de la GM que la cepa B, portadora de genes *cap5*.

En conjunto, los resultados mostraron que si bien ambas cepas lograron persistir en el tejido mamario hasta las 264 hs pi, la cepa A (procedente de un animal con IIM clínica) logró una mayor velocidad de eliminación del tejido mamario a lo largo del tiempo de muestreo, denotando menor persistencia en la GM; no así la cepa B (procedente de un animal con IIM crónica), que disminuyó notablemente su eliminación del tejido a partir de las 216 hs pi y hasta las 264 hs pi logrando adaptarse al microambiente de la GM y reactivar el proceso infeccioso.

Otro de los objetivos específicos propuestos en el presente trabajo fue estudiar si la inoculación IM de dos cepas con diferentes potenciales infecciosos, por un lado una cepa A de baja adaptación a la GM bovina y por otro, una cepa B de alta adaptación a la GM bovina, inducen una respuesta inmune diferencial por parte del hospedador.

Una respuesta óptima del hospedador contra los patógenos causantes de mastitis ocurre cuando los mecanismos inmunes están estrechamente regulados para lograr la eliminación del patógeno y devolver al sistema inmune a la homeostasis. Una rápida resolución de la IIM eliminará el daño provocado al tejido y evitará cambios en la calidad y cantidad de leche. Sin embargo, determinados patógenos causantes de mastitis como *S. aureus*, han desarrollado propiedades intrínsecas que dificultan su eliminación por el sistema inmune del huésped y los intentos locales para controlar el proceso infeccioso por parte del sistema de defensas de la GM, a menudo, resultan en significativos daños al tejido con la consecuente disminución en la producción de leche (Aitken y col., 2011).

La respuesta del tejido mamario a las IIM en bovinos en lactancia como resultado tanto de infecciones naturales como experimentales ha sido cuantificada utilizando técnicas histológicas y citológicas. En general, todos los trabajos coinciden en que los cuartos con infecciones naturales muestran reducida habilidad del tejido secretorio para la síntesis y secreción de leche; lo que se relaciona directamente con la disminución del

porcentajes de área ocupada por epitelio y lumen alveolar e incremento del área estromal interalveolar (Akers y Nickerson, 2011; Andreotti y col., 2014).

Las diferencias histopatológicas entre mastitis aguda y crónica en GM bovina fueron descritas tempranamente por Spencer (1949) y recientemente revisadas por Akers y Nickerson (2011). Los autores describieron que durante las infecciones agudas por *S. aureus* los conductos de mediano y pequeño calibre estaban ocluidos con fibrina, leucocitos y bacterias. Las células epiteliales mostraban un aspecto vacuolado y los lúmenes alveolares distendidos dado por la estasis de la leche, para luego disminuir de tamaño debido al edema intersticial. Como resultado del bloqueo de los conductos, las bacterias se multiplican y propagan produciendo focos microscópicos de infección resultando en involución y necrosis. En cambio en la mastitis crónica los autores observaron focos dispersos de infección dado por la obstrucción de pequeños conductos, con áreas focalizadas de lesión con infiltración de fagocitos y linfocitos. En los estadios avanzados de la infección observaron hipertrofia de conductos e invaginaciones intraductales de células y coágulos de leche. Finalmente, las áreas dañadas se tornan afuncionales por la fibrosis.

En concordancia con lo observado por Spencer (1949), en relación a la mastitis aguda, en el presente trabajo con la cepa A de *S. aureus* desde las 6 hs pi hasta las 24 hs pi sólo se evidenció abundante exudado de neutrófilos en el interior de conductos y alvéolos, pero a partir de las 24 y hasta las 72 hs pi se evidenciaron áreas extensas de tejido mamario dañado, focos de necrosis con pérdida de la estructura alveolar, hiperemia, presencia de abundante exudado de neutrófilos en las luces de conductos y alvéolos, macrófagos y células epiteliales descamadas. Al día 5 pi, se observaron zonas de parénquima normal y otras áreas con abundante infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar, leve hiperplasia epitelial de conductos, gran cantidad de macrófagos, fibroblastos y fibras colágenas. Presencia de focos con neutrófilos y proliferación del tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones. Al día 7 y 11 pi se evidenciaron áreas focales extensas con pérdida de la arquitectura normal y reemplazo del parénquima mamario por tejido conjuntivo denso con escaso infiltrado de linfocitos.

Por otra parte, con la cepa B, desde las 24 hs hasta las 96 hs pi, se observaron diferentes grados de lesión del tejido mamario. En zonas definidas del parénquima se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos coincidiendo con Pattison y col. (1958) quienes encontraron que después de la penetración de bacterias, la multiplicación y la invasión del sistema ductal mamario se produce

infiltración de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes, con conservación de la estructura epitelial. En otras zonas, se observó exudado con abundantes neutrófilos y alteración de la estructura alveolar con paredes irregulares, células epiteliales desprendidas en los lúmenes y macrófagos con citoplasmas de aspecto vacuolado. En el tejido conjuntivo se observó hiperemia, infiltrado de macrófagos, linfocitos, eosinófilos. A partir del día 5 y hasta el día 11 pi coexistieron en el mismo corte áreas de parénquima con alvéolos activos secretores y conductos con estructura conservada, áreas focalizadas de alvéolos afuncionales con luces irregulares y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante tejido conjuntivo circunscribiendo las lesiones y áreas focalizadas de alvéolos con exudado de neutrófilos en sus lúmenes. Estas lesiones son similares a las descritas por Spencer (1949) en cortes de tejido mamario bovino procedentes de mastitis crónicas donde observó áreas focalizadas y dispersas de reacción inflamatoria y áreas dañadas afuncionales por la fibrosis.

A partir de los resultados del examen histopatológico descritos en el presente estudio, se podría inferir que ambas cepas de *S. aureus* fueron capaces de estimular el reclutamiento de células inflamatorias a la GM y que como lo mencionan otros autores, esto podría influenciar el resultado de la interacción entre la bacteria y el hospedador hacia la resolución o hacia la cronicidad (Detilleux, 2004; Tuchscher y col., 2005). La cepa A de *S. aureus* a la dosis de inoculación empleada fue capaz de inducir un daño severo y extenso al tejido mamario causando un proceso inflamatorio agudo; asimismo fue capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria efectiva que logró disminuir el número de bacterias de la GM lo cual ocurrió a expensas de la integridad del tejido. En cambio la cepa B, a la dosis de inoculación empleada, indujo un proceso inflamatorio crónico con áreas de daño focalizadas y si bien logró desencadenar una respuesta inflamatoria, la misma no logró controlar el proceso infeccioso, demostrado por el alto número de bacterias recuperadas de la GM hasta el día 11 pi. A partir de estos resultados se puede inferir que ambas cepas reflejaron el comportamiento clínico observado en el bovino.

Con respecto a los controles no se observaron infiltraciones de leucocitos ni tampoco tejidos dañados. Lo que se observó fueron alvéolos con estructura histológica normal, conteniendo proteínas de la leche (cuerpos amiloides), grasa y gotas de lípidos como productos de secreción sin infiltración inflamatoria en el tejido conjuntivo

interalveolar, concordando con hallazgos de otros autores en tejidos mamarios no infectados (Leitner y col., 2003).

5.7. Evaluación de componentes celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa

En la GM, el número y la distribución de los leucocitos son importantes para el éxito de las defensas contra los patógenos de la ubre. Por otra parte, su distribución en diferentes compartimentos de la GM puede tener un papel importante en la protección contra los patógenos y/o en la recuperación de la infección. Muchos estudios se han enfocado en el estudio de las células somáticas y su distribución en la leche, pero los leucocitos que se encuentran en el tejido mamario difieren de los de la leche y pueden jugar un rol más importante que el de las células somáticas en la respuesta inmune (Leitner y col., 2003). Cabe destacar que son muy escasos los trabajos procedentes de bovino y ratón en los cuales se identificaron in situ células inmunes en GM infectadas con *S. aureus* en diferentes etapas del proceso infeccioso, destacando la relevancia de los resultados obtenidos en este estudio.

La infección de la GM por *S. aureus* se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos, activación de linfocitos y producción de citoquinas. El cambio de las subpoblaciones de estas células durante las fases agudas y crónicas de las mastitis causadas por *S. aureus* no se ha esclarecido completamente. Por otra parte, la actividad de las células inmunes durante los estadios tempranos de la patogenia tiene un rol central en el establecimiento de la IIM, cumpliendo un papel principal los macrófagos como primera línea de defensa frente a la exposición a productos bacterianos (Rainard y Riollet, 2006). Las funciones de los macrófagos en el sistema de defensa innato consisten en reconocer, fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de oxígeno. Más allá de la actividad como fagocitos profesionales, la habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad de otros tipos celulares, sería la de mayor importancia en la respuesta innata de la GM (Sordillo y Streicher, 2002).

El CD14 es el receptor más importante de LPS sobre monocitos-macrófagos y neutrófilos y está relacionado con la activación de dichas células por ésta molécula. Este receptor, es abundante en la membrana celular de monocitos y macrófagos, y se encuentra en menor proporción en neutrófilos (Sohn y col., 2004). Los macrófagos y

LPMN bovinos, expresan CD14 de membrana sobre su superficie celular (Paape y col., 1996). El número de CD14 expresado en la superficie en monocitos y neutrófilos puede ser alterado por diferentes citoquinas (Landman y col., 1996, Dimri y col., 1994). El CD14 puede unirse a una variedad de productos bacterianos (Pugin y col., 1994), lo que indica su importancia en las enfermedades infecciosas y en las IIM por *S. aureus*.

En el presente estudio se utilizó un anticuerpo monoclonal anti CD14 que permitió identificar y cuantificar monocitos-macrófagos en tejido mamario murino luego de la inoculación IM de las cepas A y B de *S. aureus* y de solución fisiológica (control). Nuestros resultados mostraron que el número de monocitos-macrófagos aumentó significativamente en las GM inoculadas tanto con la cepa A como con la cepa B con respecto al control a partir de las 6 hs pi y este aumento continuó en forma gradual hasta las 48 hs pi. El número de monocitos-macrófagos cuantificados fue similar para ambas cepas hasta las 48 hs pi, a excepción de las 6 hs pi donde el número de células fue significativamente superior para la cepa A. Un hallazgo llamativo fue la disminución marcada en el número de monocitos-macrófagos en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus* a las 96 y 120 hs pi con respecto a la cepa A. Esta disminución marcada en el número de células inmunes coincidió con el menor número de UFC/ml recuperados de la GM para la cepa B con respecto a la cepa A en los mismos periodos pi. A partir de estos datos se podría inferir que en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*, entre las 96 y 120 hs pi, el sistema inmune indujo una respuesta protectora que logró el control parcial del patógeno; en cambio para la cepa A si bien el número de monocito-macrófagos continuó elevado, también sucedió lo mismo con el número de UFC/ml recuperadas del tejido mamario, indicando una respuesta inmune menos efectiva. Estos resultados se revirtieron a partir de las 168 hs pi donde número de monocitos-macrófagos en las GM inoculadas con la cepa B aumentó en forma marcada con respecto al periodo anterior alcanzando números similares al observado con la cepa A. En los siguientes periodos y hasta las 264 hs pi, el número de monocitos-macrófagos en las GM inoculadas con la cepa B continuó aumentado hasta alcanzar números significativamente superiores a los observados para la cepa A a las 264 hs pi. Este aumento en el número de células inmunes para la cepa B se relacionó con el elevado número de UFC/ml recuperadas de las GM inoculadas que fue significativamente superior al observado para la cepa A en este mismo periodo. Esto indicaría una re-estimulación de los monocito-macrófagos y la consecuente reagudización del proceso infeccioso en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus*. Para la cepa A, el número

de monocito-macrófagos continuó elevado, pero la cantidad de bacterias recuperadas disminuyó notablemente a las 264 hs pi, por lo cual podríamos inferir que la presencia de estas células inmunes estuvo asociada en este periodo a un mayor control de la infección.

En concordancia con estos hallazgos en GM de ratón, en un estudio realizado en tejido mamario proveniente de vacas crónicamente infectados con *S. aureus* en período de involución activa, se observó un incremento en el número de monocitos/macrófagos inmunomarcados con anti CD14 en GM infectadas con *S. aureus* en comparación con glándulas no infectadas (Dallard y col., 2009). Por otra parte, Leitner y col. (2003) estudiaron la distribución de células inmunes en tejido mamario infectado crónicamente con *S. aureus* y en tejido mamario sano, mostrando un número elevado de macrófagos en la mayoría de los cuartos infectados, localizados alrededor del tejido conectivo y dentro del lumen alveolar coincidiendo con lo observado en el presente estudio en GM de ratón. Los resultados obtenidos en este trabajo, en asociación con los de otros autores, confirman que los monocitos-macrófagos juegan un rol importante en las IIM causadas por *S. aureus* asociado a un intento de controlar el proceso infeccioso y reparar el daño ocasionado en el tejido mamario.

Los linfocitos son una parte importante de la defensa inmune adaptativa contra las IIM, pero el tráfico de diferentes subconjuntos de linfocitos durante las fases aguda y crónica de la mastitis por *S. aureus* no se ha dilucidado completamente (Grönlund y col., 2006). La mayoría de los estudios sobre el efecto de la mastitis por *S. aureus* en subpoblaciones de linfocitos se ha realizado a partir de muestras de leche y sangre y se han centrado tanto en mastitis clínica aguda (Taylor y col., 1997; Soltys y Quinn, 1999; Grönlund y col., 2006) como en mastitis subclínica crónica (Grönlund y col., 2006; Shoshani y col., 2000; Riollet col., 2001; Nagahata y col., 2011). Durante las IIM causadas por *S. aureus* en GM bovina se han reportado incrementos tanto de linfocitos CD4+ como CD8+ y un predominio de este último tipo de células cuando la infección se establece, sugiriendo un importante rol de los linfocitos CD8+ en la mastitis crónica causada por *S. aureus* (Riollet y col., 2001; Rivas y col., 2002; Grönlund y col., 2006).

En nuestro estudio el número de linfocitos CD4+ y CD8+ así como el de linfocitos B CD79+ cuantificados a partir de tejido mamario inoculado con las cepas A y B de *S. aureus* fue significativamente superior al observado en los tejidos mamaros controles inoculados con solución fisiológica. Si bien el aumento de las subpoblaciones de linfocitos observadas con respecto al control fue mayor a lo largo de todo el periodo

de muestreo, este incremento fue notorio a partir de las 96 hs pi, indicando la estimulación de la respuesta inmune adaptativa del hospedador por parte de ambas cepas evaluadas.

Cabe destacar que los trabajos realizados en modelos murinos de infección experimental por *S. aureus* que reporten cambios en las subpoblaciones de linfocitos T en el tejido mamario son escasos (Cao y col., 2012). En el presente estudio, en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus* a las 96 hs pi se produjo un pico en el número de linfocitos tanto CD4+ como CD8+ con predominio de los linfocitos CD4+ arrojando valores promedios de 463,64 células/mm² contra 402,53 linfocitos CD8+/mm². A los 11 días pi el número de linfocitos CD4+ y CD8+ disminuyó alcanzando promedios de 317,35 células/mm² y 262,52 células/mm², respectivamente. Por otra parte, en las GM inoculadas con la cepa B de *S. aureus* el pico en el número de linfocitos CD4+ se produjo también a las 96 hs pi, pero el número de linfocitos fue menor que el observado para la cepa A (408,91 células/mm² promedio) y el número de linfocitos CD8+ fue en promedio 365,49 células/mm², también menor al observado para la cepa A. A los 11 días pi el número de linfocitos CD4+ alcanzó un promedio de 412,38 células/mm², mucho mayor al observado para la cepa A y el número de linfocitos CD8+ promedio fue de 351,69 células/mm², valor también superior al observado para la cepa A. En bovinos, Grönlund y col. (2006) demostraron cambios en las proporciones de linfocitos CD4+ y CD8+ obtenidos a partir de leche en cuartos infectados experimentalmente con *S. aureus*, reportando un aumento de la relación CD4+:CD8+ en la fase aguda de la infección y un cambio en la relación con predominio de células CD8+ a los 22 y 26 días durante la fase crónica de la IIM. Sin embargo, a los 29, 33 y 36 días pi los autores volvieron a observar un predominio de los linfocitos CD4+. En el presente estudio, no se observó una inversión de la relación CD4+:CD8+ y el número promedio de linfocitos CD4+ fue siempre mayor al de los linfocitos CD8+ tanto en las GM inoculadas con la cepa A como con la cepa B de *S. aureus* durante todo el proceso infeccioso. Por otra parte, Riollot y col. (2001), en coincidencia con los hallazgos de Grönlund y col. (2006) observaron un reclutamiento mayor de linfocitos CD8+ en comparación con linfocitos CD4+ en leche procedente de vacas infectadas crónicamente por *S. aureus*, siendo más pronunciados estos tipos de linfocitos a los 5 días pi. Posiblemente la discordancia entre nuestros resultados y los hallados por Riollot y col. (2001) y Grönlund y col. (2006) se deban a que los trabajos de estos autores se realizaron a partir de leche bovina y con otros métodos de marcación de células, además como hemos mencionado

anteriormente, los leucocitos que se encuentran en el tejido mamario difieren de los de la leche y posiblemente jueguen roles diferentes en la respuesta inmune de la GM contra los patógenos.

Está claro que en la mastitis bovina las variaciones de los leucocitos observadas en diferentes etapas de la lactancia sugieren que los mecanismos defensivos dependen en gran medida de las respuestas de la inmunidad mediada por los linfocitos T; esto ha sido documentado en estudios que indican que las vacas que presentan relaciones CD4:CD8 menores de 1.0 en ambos sistemas, sangre periférica y secreciones mamarias, son animales significativamente más susceptibles a la mastitis (Park y col., 2004).

En nuestro estudio, el aumento en el número de linfocitos CD4+ para ambas cepas evaluadas fue gradual a partir de las 6 hs hasta alcanzar un pico a las 96 hs pi. Estos hallazgos se condicen con los de Cao y col. (2012) que observaron un aumento significativo en el número de linfocitos CD4+ a las 72 hs pi de *S. aureus* en GM de ratones lactantes. En nuestro estudio, a las 96 hs pi el mayor número de linfocitos CD4+ se observó en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus* difiriendo en forma significativa con el número cuantificado para la cepa B y controles. En los siguientes periodos (120 hs y 168 hs pi) se observó una disminución marcada del número de linfocitos CD4+ para ambas cepas inoculadas, siendo el número de células cuantificadas similar para las cepas A y B. En los últimos períodos evaluados (216 hs y 264 hs pi) el número de linfocitos CD4+ aumentó considerablemente en las GM inoculadas con la cepa B, mostrando diferencias significativas con respecto a las GM inoculadas con la cepa A y con solución fisiológica. En estos últimos periodos evaluados, el número de linfocitos CD4+ observado en las GM inoculadas con la cepa B alcanzó valores promedios superiores a los observados a las 96 hs pi, periodo en el cual se produjo el pico de células, mostrando una respuesta inmune de memoria efectiva.

En relación a los linfocitos CD8+, el aumento en el número de células para ambas cepas evaluadas fue gradual a partir de las 6 hs hasta alcanzar un pico a las 96 hs pi. En este periodo, al igual que lo observado para los linfocitos CD4+, el mayor número de linfocitos CD8+ se observó en las GM inoculadas con la cepa A de *S. aureus* difiriendo en forma significativa con el número cuantificado para la cepa B y controles. Si bien el aumento de ambas poblaciones de linfocitos se observó a partir de las 6 hs pi y fue constante hasta las 96 hs pi, posiblemente la respuesta observada sea una consecuencia del entorno inflamatorio desencadenado por la respuesta inmune innata que hace que los linfocitos vírgenes que en condiciones fisiológicas circulan a través de la GM sean

atraídos y retenidos en el sitio de infección por el efecto de las quimioquinas característicos de este tipo de respuesta.

A las 120 hs pi el número de linfocitos CD8+ disminuyó en forma similar para ambas cepas evaluadas y en los tres últimos períodos (168, 216 y 264 hs pi) el número de linfocitos CD8+ aumentó considerablemente en las GM inoculadas con la cepa B, mostrando diferencias con respecto a las GM inoculadas con la cepa A y con solución fisiológica. Si bien en estos últimos periodos el número de linfocitos CD8+ aumentó considerablemente para la cepa B, su número promedio no alcanzó a superar el del pico observado a las 96 hs pi. El aumento global en el número de linfocitos CD8+ observado para ambas cepas evaluadas a lo largo del periodo de muestreo, coincide con lo reportado por otros autores en leche proveniente de bovinos con infecciones crónicas por *S. aureus* (Grönlund y col., 2006; Nagahata y col., 2011).

Con respecto a los tejidos controles inoculados con solución fisiológica, el número de linfocitos CD4+ y CD8+ en este grupo de muestreo fue menor al observado en las GM inoculadas las cepas A y B de *S. aureus* manteniendo números similares en todos los periodos evaluados. Si bien no se han reportado trabajos en GM de ratón que muestren la distribución de linfocitos CD4+ y CD8+, en GM bovina, Yamaguchi y col. (1999), estudiaron tejidos proveniente de vacas sanas y observaron que las subpoblaciones de linfocitos CD8+ fueron más altas que los de linfocitos CD4+ y que estos últimos se localizaban principalmente en los tejidos conectivos interalveolares, mientras que las células CD8+ se encontraban en estrecha proximidad con el epitelio mamario. En nuestro estudio ambos tipos de linfocitos se localizaron en el tejido conectivo interalveolar en estrecha asociación con el epitelio que reviste los alvéolos y conductos mamarios.

En el presente estudio, para la identificación de linfocitos B in situ, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti CD79. El CD79 es requerido, en cooperación con CD79b, para la iniciación de la cascada de transducción de señales activadas por la unión del antígeno al complejo receptor de antígeno de células B (BCR) que conduce a la internalización del complejo, el tráfico a los endosomas tardíos y la presentación de antígenos. También se requiere para la expresión de BCR en la superficie y para la diferenciación eficiente de pro y pre-linfocitos B. En la bibliografía no se han encontrado estudios en los cuales se utilice este anticuerpo para detección de linfocitos B por IHQ en tejido mamario murino. Sí se ha reportado su uso en tejidos humanos para expresar un amplio rango de maduración de linfocitos B, desde las células más

inmaduras a las células plasmáticas (Chu y col., 1999; Bachi y col., 1999; Chu y col. 2000; Knowles y col., 2001; Waarnker y col., 2001).

Un mecanismo utilizado por el sistema inmune para aumentar la fagocitosis y la muerte de los microorganismos infecciosos es la producción de anticuerpos específicos a niveles suficientes en el sitio de infección (Leitner y col., 2000). Como *S. aureus* puede invadir y sobrevivir intracelularmente, una estimulación preferencial de las células B, que sugiere el desarrollo de una respuesta humoral, puede no ser suficiente para eliminar las bacterias intracelulares, lo que podría explicar la persistencia de la infección (Wellnitz y col., 2012). Estudios previos han reportado aumentos en la proporción de linfocitos B en sangre de bovinos con mastitis subclínica crónica (Grönlund y col., 2006).

Leitner y col. (2003), utilizando un anticuerpo diferente al empleado en este estudio para linfocitos B (anti CD21) observaron un aumento en el número de este tipo de linfocitos en tejidos mamarios provenientes de bovinos con IIM crónicas. Asimismo en la zona cortical de los ganglios linfáticos mamarios regionales observaron marcación intensa de los linfocitos B en los folículos secundarios. Estos resultados concuerdan con los observados en este estudio donde se observó una gran densidad de linfocitos B inmunomarcados distribuidos principalmente en la zona externa (corteza) del nódulo linfóide mamario.

La dinámica del flujo de linfocitos B a la GM luego de la inoculación de las cepas A y B de *S. aureus* fue diferente para ambas cepas evaluadas. Si bien el número de linfocitos B aumentó gradualmente desde las 6 hs pi para ambas cepas, se observaron diferencias entre las mismas, ya que en las GM inoculadas con la cepa A el número de linfocitos B alcanzó un pico a las 96 hs pi para descender en forma paulatina hasta alcanzar valores significativamente inferiores a los de la cepa B en los últimos periodos de muestreo (118, 216 y 264 hs pi). Por su parte, la cepa B, estimuló el flujo de linfocitos B a la GM en forma más rápida que la cepa A hasta las 72 hs pi, pero no alcanzó el pico observado con la cepa A a las 96 hs pi, sino que el número de linfocitos continuó incrementándose a lo largo de todo el periodo de muestreo hasta alcanzar los máximos valores a las 264 hs pi. Si bien ambas cepas estimularon el flujo de linfocitos B a la GM de ratón, la cepa B demostró el desarrollo de una respuesta inmune humoral más evidente y sostenida a lo largo del periodo de muestreo. No se han reportado trabajos que cuantifiquen linfocitos B en GM de ratón luego de la infección IM por *S. aureus*. Sin embargo, en IIM crónicas por *S. aureus* en GM bovina se han reportado

números elevados de linfocitos B, coincidiendo con los resultados de este trabajo (Riollet y col., 2001; Grönlund y col., 2006).

Las dinámicas de las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ y de los linfocitos B observadas en las GM inoculadas con las cepas A y B de *S. aureus*, en general, se encontraron relacionadas, observándose un aumento evidente en las tres poblaciones celulares hasta las 96 hs pi y una disminución marcada entre las 120 y 168 hs pi, para alcanzar nuevamente números elevados de células, sólo en las GM inoculadas con la cepa B, a las 216 y 264 hs pi. Estos resultados indican que ambas cepas fueron capaces de inducir en el hospedador una respuesta inmune adaptativa contra el patógeno en el sitio de inoculación. La infección por la cepa A fue controlada más efectivamente que la ocasionada por la cepa B, estableciéndose un mayor reclutamiento de células inmunes (monocitos-macrófagos, linfocitos T y B) a la GM hasta las 96 hs pi lográndose una menor progresión del proceso infeccioso, demostrado por el menor número de bacterias recuperadas de la GM al final del ensayo, lo cual se produjo a expensas de un mayor daño tisular que el ocasionado por la cepa B. Por otra parte, la infección por la cepa B fue menos efectivamente controlada, aunque se estableció un alto aflujo de células inmunes a la GM durante las primeras 96 hs pi (principalmente linfocitos CD4+ y CD8+), el número de monocitos-macrófagos y de linfocitos B fue inferior al observado para la cepa A en este mismo periodo. Si bien en los tres últimos periodos evaluados (118, 216 y 264 hs pi) el aflujo de células inmunes a la GM estimuladas por la cepa B (monocitos-macrófagos, linfocitos T y B) se incrementó notablemente, éste no fue eficiente en el control de la infección a juzgar por el alto número de UFC/ml recuperadas de la GM en estos periodos.

Como hemos mencionado anteriormente, en el presente trabajo, hemos observado un aumento gradual en el número de linfocitos T y B a partir de las 6 hs pi y hasta las 96 hs pi que posiblemente sea una consecuencia del entorno inflamatorio desencadenado por la respuesta inmune innata que hace que los linfocitos vírgenes que en condiciones fisiológicas circulan a través de la GM sean atraídos y retenidos en el sitio de infección por el efecto de las quimioquinas característicos de este tipo de respuesta. Por lo tanto, en el presente trabajo, hasta las 96 hs pi no es posible discriminar entre una respuesta inmune adaptativa conformada por células específicas y efectoras o por células colaboradoras activadas. Se necesitan futuros estudios que permitan analizar la especificidad de las poblaciones celulares evaluadas.

El hallazgo principal de este estudio, a partir de la evaluación de los componentes celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa, es que la respuesta inmune del hospedador fue diferente para cada cepa de *S. aureus* evaluada, observándose en general una mayor y más efectiva respuesta inicial para la cepa A con respecto a la B y posteriormente una segunda respuesta celular, estimulada principalmente por la cepa B y posiblemente debida a la reagudización del proceso infeccioso, que no fue efectiva para controlar la infección.

6. CONCLUSIONES



- Las diferentes intensidades en la capacidad para producir hemolisinas y formar biofilm en los aislados de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas no se asociaron con el tipo de infección establecida en la GM, variando ampliamente entre las cepas estudiadas.
- Existe una elevada diversidad genética entre los aislados de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas, dada la agrupación de los mismos en diferentes pulsotipos.
- La baja resistencia a penicilina y ausencia de multi-resistencia de las cepas de *S. aureus* analizadas no estuvo asociada con el tipo de infección establecida en la GM. La totalidad de las cepas resistentes mostraron capacidad de producir β -lactamasa y portaron el gen blaZ.
- La prevalencia de los genes codificantes de proteínas asociadas a adherencia celular y formación de biofilm fue elevada entre aislados de *S. aureus* procedentes de IIM clínicas y subclínicas y todos los aislados mostraron poseer al menos uno de los genes que codifican para proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina y formación de biofilm.
- Los porcentajes de internalización al epitelio mamario no se asociaron con la manifestación clínica de las IIM.
- No se encontró relación entre los niveles de expresión de genes de adherencia y formación de biofilm, con los porcentajes de internalización para cada aislado.
- La expresión relativa de los genes codificantes de adhesinas y proteínas asociadas a biofilm fue significativamente superior al control en bacterias internalizadas y en bacterias no internalizadas fue moderada o sin diferencia con respecto al control. La expresión de estos genes se encontró principalmente ligada a cada aislado de *S. aureus*, sin mostrar relación con las características de la IIM producida (clínica o subclínica).
- Las velocidades de crecimiento en cultivo se asociaron con las características de la IIM producida, observándose tiempos de duplicación bacteriana más cortos en las cepas procedentes de IIM clínicas en relación a las procedentes de IIM subclínicas.
- La cepa A de *S. aureus* fue capaz de inducir un daño severo y extenso al tejido mamario causando un proceso inflamatorio agudo; asimismo fue capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria efectiva que logró disminuir el número de bacterias de la GM lo cual ocurrió a expensas de la integridad del tejido. La cepa B, indujo un proceso inflamatorio crónico con áreas de daño focalizadas y si bien logró desencadenar una respuesta inflamatoria la misma no logró controlar el proceso infeccioso, demostrado

por el alto número de bacterias recuperadas de la GM hasta el día 11 post infección. Ambas cepas reflejaron el comportamiento clínico observado en el bovino.

- El número de monocitos-macrófagos, linfocitos CD4+ y CD8+ así como el de linfocitos B CD79+ cuantificados a partir de tejido mamario inoculado con las cepas A y B de *S. aureus* fue significativamente superior al observado en los tejidos mamaros controles a lo largo de todo el periodo de muestreo, indicando la estimulación de la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador por parte de ambas cepas evaluadas.
- La cepa A, en comparación con la B, estimuló un mayor reclutamiento de monocitos-macrófagos, linfocitos T y B a la GM hasta las 96 horas pi, lo cual logró controlar el proceso infeccioso, demostrado por el menor número de bacterias recuperadas de la GM al final del ensayo, aunque esta respuesta se produjo a expensas de un mayor daño al tejido mamario que el ocasionado por la cepa B. La cepa B, aunque logró un alto aflujo de células inmunes a la GM durante las primeras 96 horas pi (principalmente linfocitos CD4+ y CD8+), el número de monocitos-macrófagos y de linfocitos B fue inferior al observado para la cepa A en este mismo periodo. Si bien a las 118, 216 y 264 horas pi, el aflujo de monocitos-macrófagos, linfocitos T y B a la GM estimuladas por la cepa B se incrementó notablemente, éste no fue eficiente en el control de la infección a juzgar por el alto número de UFC/ml recuperadas de la GM en estos periodos.
- La respuesta inmune del hospedador fue diferente para cada cepa de *S. aureus* evaluada, observándose en general una mayor y más efectiva respuesta inicial para la cepa A con respecto a la B. Posteriormente una segunda respuesta celular, estimulada principalmente por la cepa B y posiblemente debida a la reagudización del proceso infeccioso, que no fue efectiva para controlar la infección.

7. BIBLIOGRAFÍA



- Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS*. 107:425-30.
- Aarestrup FM, Wegener H, Rosdahl V. 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary Microbiology*. 45:139-50.
- Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 16:291-304.
- Akers RM, Nickerson SC. 2011. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 6:275-289.
- Akineden O, Annemüller C, Hassan AA, Lämmle C, Wolter W, Zschöck M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8:959-964.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4:499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. 2003. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 50:105-111.
- Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry J, Oliver SP. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci*. 79: 1021-1026.
- Anderson JC, Chandler RL. 1975. Experimental staphylococcal mastitis in the mouse. Histological, ultrastructural and bacteriological changes caused by a virulent strain of *Staphylococcus aureus*. *J Comp Pathol*. 85:499-510.

- Anderson JC, Howard CJ, Gourlay RN. 1976. Experimental Mycoplasma mastitis in mice. *Infect Immun.* 13:1205-1208.
- Anderson JC, Heneghan DJ. 1979. Extrapolation from experimental chronic staphylococcal mastitis in mice to experimental infections in cattle. *Br Vet J.* 135:527-535.
- Anderson JC. 1981. The effect of suckling on the course of experimental staphylococcal mastitis in the mouse. *Br Vet J.* 137:489-500.
- Anderson JC. 1983. Veterinary aspects of staphylococci, in *Staphylococci and Staphylococcal infections*, A.C. Easmon C.S.F., Editor. Academic Press: London-New York. p. 193-241.
- Anderson JC, Craven N. 1984. Assessment in the mouse of cefoperazone as a treatment for mastitis. *Vet Rec.* 114:607-612.
- Andreotti CS, Pereyra EA, Baravalle C, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE. 2014. Staphylococcus aureus chronic intramammary infection modifies protein expression of transforming growth factor beta (TGF- β) subfamily components during active involution. *Res Vet Sci.* 96:5-14.
- Angelini DJ, Hasday JD, Goldblum SE, Bannerman DD. 2005. Tumor necrosis factor- α mediated pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Curr Respir Med Rev.* 1:233-246.
- Arbeit R, Nelles M. 1987. Capsular polysaccharide antigenemia in rats with experimental endocarditis due to Staphylococcus aureus. *J Infect Dis.* 155:242-246.
- Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* 2:445-459.

- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L . 2001. Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 39:2151-2156.
- Arslan S, Özkardes F. 2007. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 102:29-33.
- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. Interleukin-10 therapy-Review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 55:241-269.
- Asai K, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M, Kumagai K. 1998. Variation in CD4C T and CD8C T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol.* 65:51-61.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:463-472.
- Bannerman DD, Paape MJ, Chockalingham A. 2006. Staphylococcus aureus intramammary infection elicits increased production of transforming growth factor- α , β 1, and β 2. *Vet Immunol Immunopathol.* 112:309-315.
- Bannerman DD. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci.* 87:10-25.
- Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil J, Ote I. 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 169:74-79.
- Bardoel BW, Striip JA. 2011. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. *J Mol Recognit.* 24:1077-1086.

- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.*89:1877-1895.
- Barrio MB, Rainard P, Prevost G. 2006. LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect.* 8:2068-2074.
- Bayles K, Wesson C, Liou L, Fox L, Bohach G, Trumble W. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 66:336-342.
- Bedolla C, Castañeda V. 2003. Agentes patógenos causantes de la mastitis bovina. *Cuatro Vientos. Universidad Michoacana de Sn Nicolás de Hidalgo.* 38:27-29.
- Bedolla C, Ponce De León M. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Red Vet.* 9:2-26.
- Beltramino S, Milanesio D, Baravalle C, Dallard BE. 2012. Puesta a punto de un modelo murino de mastitis inducida por *Staphylococcus aureus*. XVI Encuentro de jóvenes investigadores de la UNL. VII Encuentro de jóvenes investigadores de Universidades de Santa Fe. Santa Fe. p 74.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 181:3733-3739.
- Bermejo V, Spadaccini L, Elbert G, Duarte A, Erbin M, Cahn P. 2012. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. *Medicina* 72:283-286.
- Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FG, Rainard P. 2010. Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 17:1797-1809.

- Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec.* 160:253-257.
- Brakstad OG, Maeland JA. 1997. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. Review. *APMIS* 105: 264-276.
- Bramley AJ, Patel AH, O'Reilly M, Foster R, Foster TJ. 1989. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect Immun.* 57:2489-2494.
- Bramley AJ, Foster R. 1990. Effects of lysostaphin on *Staphylococcus aureus* infections of the mouse mammary gland. *Res Vet Sci.* 49:120-121.
- Brenaut P, Lefèvre L, Rau A, Laloë D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res.* 45:16.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-1535.
- Brouillette E, Grondin G, Shkreta L, Lacasse P, Talbot BG. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog.* 35:159-168.
- Brouillette E, Malouin F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect.* 7:560-568.
- Brouillette E, Grondin G, Talbot BG, Malouin F. 2005. Inflammatory cell infiltration as an indicator of *Staphylococcus aureus* infection and therapeutic efficacy in experimental mouse mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 104:163-169.

- Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev.* 214:73-79.
- Buzzola FR, Quelle L, Gomez MI, Catalano M, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Denamiel G, Sordelli DO. 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol Infect.* 126:445-452
- Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LP, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvino LF, Sordelli, DO. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infect Immun.* 75:886-891.
- Calvino LF, Donnelly WJ, Dodd K. 1993. Effect of partially purified *Staphylococcus aureus* Beta-haemolysin on the mammary gland of the mouse. *J Vet Med.* 40:559-568.
- Calvino LF, Almeida R, Oliver S. 1998. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 61:93-110.
- Calvino LF, Tirante L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev. FAVE, Sección Ciencias Veterinarias.* 4:29-40.
- Camussone C, Rejf P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I, Calvino L. 2012. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Braz. J. Microbiol.* 43:1010-1014.
- Camussone CM, Veaute CM, Porporatto C, Morein B, Marcipar IS, Calvino LF. 2013. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *J Dairy Res.* 80: 72-80.

- Cao D, jing X, Wang X, Liu H, Chen D. 2012. Dynamics of CD4+ Lymphocytes in Mouse Mammary Gland Challenged with Staphylococcus aureus. Asian J Anim Vet Adv.7:1041-1048.
- Capurro A, Aspán A, Artursson K, Waller KP. 2010. Genotypic variation among Staphylococcus aureus isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. Vet J. 185:188-192
- Castro F, Rojas P, Rodríguez L. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. Rev Agro-Ciencia. 22:49-58.
- Chandler RL. 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. J Med Microbiol. 3:273-282.
- Chandler RL, Smith K, Turfrey BA. 1980. Studies on the phagocytic potential of secretory epithelial cells in experimental mastitis. J Comp Pathol. 90:385-394.
- Chavhan SK, Kalorey DR, Nagdive AA, Purohit HJ, Barbuddhe SB, Kurkure NV. 2012. Molecular characterization of intercellular adhesion gene in Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitic milk. Trop Anim Health Prod. 44:247-252.
- Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. 2004. What is Transforming Growth Factor Beta (TGF- β). The British Association of Plastic Surgeons. 57:215-221.
- Chockalingam A, Paape MJ, Bannerman DD. 2005. Increased milk levels of transforming growth factor- α , β 1, and β 2 during Escherichia coli-induced mastitis. J Dairy Sci. 88:1886-1893.
- Chu P, Chang K, Arber D, Weiss L. 1999. Practical applications of immunohistochemistry in hematolymphoid neoplasms. Ann Diagn Pathol.3:104-133.
- Chu P, Chang K, Arber D, Weiss L. 2000. Immunophenotyping of Hematopoietic neoplasms. Sem diag pathol. 17: 236- 256.

- Chung PY, Navaratnam P. 2013. Identification, by gene expression profiling analysis, of novel gene targets in *Staphylococcus aureus* treated with betulinaldehyde. *Res Microbiol.* 164:319-326.
- Cifrian E, Guidry AJ, Bramley AJ, Norcross NL, Bastida-Corcuera FD, Marquardt WW. 1996. Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 48:187-198.
- Ciftci A, Onuk EE, Findik A, Yildirim T, Sogut MU. 2009. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction based on coagulase and protein A gene polymorphisms. *J Vet Diagn Invest.* 21:849-853.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 28: M31-A3.
- Cocchiario J, Gomez M, Risley A, Solinga R, Sordelli D, Lee J. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from nontypeable *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 59:948-960.
- Cohen TS, Prince AS. 2013. Bacterial pathogens activate a common inflammatory pathway through IFN γ regulation of PDCD4. *PLoS Pathog.* 9:1003682.
- Conley J, Olson M, Cook LS, Ceri H, Phan V, Davies HD. 2003. Biofilm formation by group A *Streptococci*: is there a relationship with treatment failure. *J Clin Microbiol.* 41:4043-4048.
- Corbellini CN. 1996. Actualización en la patogenia y diagnóstico de las mastitis en: Memorias Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis, ALMAST, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.37-48.

- Cork MJ, Duff GW. 1994. Interleukin-1. En: *Epidermal Growth Factors and Cytokines*. (Eds. Luger, T.A., Schwarz, T.), Marcel Dekker, New York, p. 19-48.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. 2000. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol.* 38:1747-1752.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67: 5427-5433.
- Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, Morandi S, Luzzana M. 2006. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *J Dairy Sci.* 89:163-169.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183:2888-2896.
- Cucarella C, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, Penadés JR. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun.* 70:3180-3186.
- Cucarella C, Ángeles Tormo M, Ubeda C, Pilar Trotonda M, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades JS. 2004. Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72:2177-2185.
- Cunnion K, Zhang H, Frank M. 2003. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. *Infect Immun.* 71:656- 662.
- Dallard BE, Baravalle C, Ortega HH, Tumini M, Canavesio VR, Neder VE, Calvino LF. 2009. Effect of a biological response modifier on expression of CD14

- receptor and tumor necrosis factor- α in *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands at drying off. *Vet Immunol Immunopathol.* 32:237-42.
- Dallard BE, Baravalle C, Andreotti C, Ortega HH, Neder V, Calvino LF. 2011. Intramammary inoculation of *Panax ginseng* extract in cows at drying off enhances early mammary involution. *J Dairy Res.* 78:63-71.
- Daniel CW, Robinson S, Silberstein GB. 2001. The transforming growth factors beta in development and functional differentiation of the mouse mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 501:61-70.
- Dassy B, Stringfellow W., Lieb M, Fournier J. 1991. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semisynthetic medium. *J Gen Microbiol.* 137:1155-1162.
- De Vliegher S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.* 95:1025-1040.
- Dernfalk J, Persson Waller K, Johannisson A. 2007. The xMAP technique can be used for detection of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in bovine samples. *Vet Immunol Immunopathol.* 118:40-49.
- Desroche N, Beltramo C, Guzzo J. 2005. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J Microbiol Methods.* 60:325-33.
- Detilleux, J. C. 2004. Neutrophils in the war against *Staphylococcus aureus*: predator-prey models to the rescue. *J. Dairy Sci.* 87:3716–3724.
- Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe SB, Kurkure NV. 2010. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun.* 34:81-89

- Di Giovine FS, Duff GW. 1990. Interleukin-1: the first interleukin. *Immunol Today*. 11:151-152.
- Di Giovine FS, Symons JA, Duff GW. 1991. Kinetics of IL-1 beta mRNA and protein accumulation in human mononuclear cells. *Immunol Lett*. 29:211-218.
- Dickson RB, Lippman ME. 1995. Growth factor in breast cancer. *Endocrine Rev*. 16:559-589.
- Dimri R1, Nissimov L, Keisari Y. 1994. Effect of human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-3 on the expression of surface markers of human monocyte-derived macrophages in long-term cultures. *Lymphokine Cytokine Res*. 13:239-245.
- Dinarello CA, Moldawer LL .1999. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Amgen, Thousand Oaks, CA, USA. 2971-2980.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 13:16-34.
- Djabri B, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a metaanalysis. *Vet Res*. 33:335-357.
- Dos Santos J, Netto Dos Santos K, Gentiline E, Sordelli D, De Freire Bastos M. 2002. Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 85:133-144.
- Dunne WM Jr. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 15:155-166.
- Dziewanowska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun*. 67:4673-4678.

- Elazar S, Gonen E, Livneh-Kol A, Rosenshine I, Shpigel NY. 2009. Neutrophil recruitment in endotoxin-induced murine mastitis is strictly dependent on mammary alveolar macrophages. *Vet Res.* 41:10-16.
- Faimboim L, Geffner J. 2008. *Introducción a la inmunología humana*. 5ta. Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 51-88.
- Felipe V, Somale P, Varroni F, Morgante C, Porporatto C. Capacidad formadora de biofilm en aislamientos bovinos de *Staphylococcus aureus*. XIII Congreso de Microbiología. *Revista de Microbiología*. Bs. As. Argentina. 23 al 26 de septiembre 2013.54:24.
- Fernández Botran R, Chilton PM, Ma Y. 1996. Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. *Adv Immunol.* 63:269-336.
- Ferreiros E, Casabé J, Nacinovich F, Swieszkowski S, Cohen H, Cortes C, Modenesi J, Varini S. 2006. Endocarditis infecciosa por *S. aureus* en la Argentina: EIRA 2. Análisis comparativo luego de 10 años de los estudios EIRA 1 y 2. *Revista Argentina de cardiología.* 74:283 -290.
- Fey PD, Olson ME. 2010. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Fut Microbiol.* 5:917-933.
- Finlay BB, Cossart P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 5313:718-725.
- Flanders KC, Wakefield LM. 2009. Transforming growth factor-(beta)s and mammary gland involution; functional roles and implications for cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 14:131-44.
- Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB. 1992. Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol.* 118:901-909.
- Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* 3:948-958.

- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.*12:49-62.
- Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, Graber H.U. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 85:439-448.
- Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Hook M. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 79:672-679.
- Fox K, Stewart G, Fox A. 1998. Synthesis of microcapsule by *Staphylococcus aureus* is not responsive to environmental phosphate concentrations. *Immunology.* 66:4004-4007.
- Franklin D, Lowy M. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339:520-532.
- Frola ID, Odierno LM, Bogni CI, Pellegrino MS. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche. *REDVET - Revista Electrónica de Veterinaria.* 12:1-14.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muniz J, Alvarez MA, Martin MC. 2005. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J Clin Microbiol.* 43:1278-1284.
- Garofalo A, Gai C, Lattar S, Gardella N, Mollerach M, Kahl BC, Becker K, Prince AS, Sordelli DO, Gómez MI. 2012. The length of the *Staphylococcus aureus* protein A polymorphic region regulates inflammation: impact on acute and chronic infection. *J Infect Dis.* 206:81-90.

- Garzoni C, Kelley WL. 2009. Staphylococcus aureus: new evidence for intracellular persistence. Trends Microbiol. 17:59-65.
- Gasque Gómez R. 2008. Enciclopedia Bovina. 2da Edición. Ed. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Capítulo 11 978-970-32-4359-4364.
- Gilbert FB, Poutrel B, Sutra L. 1994. Immunogenicity in cows of Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide-ovalbumin conjugate. Vaccine.12:369-374.
- Gilbert FB, Cunha P, Jensen K, Glass EJ, Foucras G, Robert-Granié C, Rupp R, Rainard P. 2013. Differential response of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus or Escherichia coli agonists of the innate immune system. Vet Res. 11:4440.
- Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. 2006. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical Staphylococcus aureus mastitis in lactating dairy cattle. Antimicrob Agents Chemother. 50:2912-2918.
- Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis. J Clin Microbiol. 40:4060-4067.
- Gomez MI, Sordelli DO, Buzzola FR, Garcia VE. 2002. Induction of cell-mediated immunity to Staphylococcus aureus in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. Infect Immun. 70:4254-4260.
- Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Song G, Pitt A, Cheung A, Prince A. 2004. Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. Nat Med. 10:842-848.

- Gonano M, Hein I, Zangerl, Rammelmayr A, Wagner M. 2009. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains of veterinary, dairy and human origin. *Epidemiol Infect.* 137:688-699.
- Gong R, Hu C, Xu H, Guo A, Chen H, Zhang G, Shi L. 2010. Evaluation of clumping factor A binding region A in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 17:1746-1752.
- González C. 2013. *Staphylococcus aureus* en población pediátrica: Epidemiología molecular y factores de virulencia. Tesis de doctorado en Facultad de Medicina. Departamento de Microbiología. Universidad Complutense de Madrid.p18.
- Götz F. 2002. *Staphylococcus* and biofilm. *Mol Microbiol.* 43:1367-1378.
- Graber HU, Naskova J, Studer E, Kaufmann T, Kirchhofer M, Brechbühl M, Schaeren W, Steiner A, Fournier C. 2009. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *J Dairy Sci.* 92:1442-1451.
- Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussing MJ, Charbonier JB, Silverman GJ, 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:5399-5404.
- Gresham HD, Lowrance JH, Caver TE, Wilson BS, Cheung AL, Lindberg FP. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.*164:3713-3722.
- Grönlund U, Johannisson A, Waller K. 2006. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 80:147–154.
- Guidry A, O'Brien C, Oliver S, Dowlen H, Douglass L. 1994. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. *J Dairy Sci.* 77:2965-2974.

- Guidry A, Fattom A, Patel A, O'Brien C. 1997. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol.* 59:53-58.
- Günther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res.* 40:31-39.
- Günther J, Esch K, Poschadel N, Petzl W, Zerbe H, Mitterhuemer S, Blum H, Seyfert HM. 2011. Comparative kinetics of *Escherichia coli*- and *Staphylococcus aureus*-specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 79:695-707.
- Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H. 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet Res Commun.* 25:99-08.
- Han HR, Park HM. 2000. Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit. *J Vet Med Sci.* 62:237-241.
- Han HR, Pak S, Guidry A. 2000. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. *J Vet Med Sci.*62:1331-1333.
- Harris L, Foster S, Richards R. 2002. An introduction to *Staphylococcus aureus* and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. *Eur Cell Mater.* 4:39-60.
- Harrison EM, Paterson GK, Holden MTG, Larsen J, Stegger M, Larsen AR, Petersen A, Skov RL, Christensen JM, Zeuthen AB, Heltberg O, Harris SR, Zadoks RN, Parkhill J, Peacock SJ, Holmes MA. 2013. Whole genome sequencing identifies

- zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med.* 5:509-515.
- Hartford O, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. 1997. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Mol Microbiol.* 25:1065-1076.
- Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood.* 96:2149-2156.
- Haveri M, T.S., Vuopio-Varkila J, Salmenlinna S, Pyörälä S. 2005. Bacterial Genotype Affects the Manifestation and Persistence of Bovine *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection. *J Clin Microbiol.* 43:959-961.
- Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä, S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol.* 103:993-1000
- Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Clin Microbiol.* 46:3728-3735.
- Hebert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P, Lagacé J. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett.* 193:57-62.
- Hensen SM, Pavčić MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B. 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.* 83:1966-1975.
- Herbert S, Worlitzsch D, Dassy B, Boutonnier A, Fournier J, Bellon G, Dalhoff A, Doring G. 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition in vitro and in vivo. *J Infect Dis.* 176:431-438.

- Herbert S, Newell S, Lee C, Wieland K, Dassy B, Fournier J, Wolz C, Doring G. 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide by CO₂. *J Bacteriol.* 183:4609- 4613.
- Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livest Prod Sci.* 64:95-106.
- Hillerton J, Berry E. 2005. Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism. *J Appl Microbiol.* 98:250-1255.
- Holderbaum D, Hall GS, Ehrhart LA. 1986. Collagen binding to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 54:359-364.
- Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189:8719-8726.
- Huynh HK, Oger J, Dorovinizis K. 1995. Interferon- β downregulates interferon- γ -induced class II MHC molecule expression and morphological changes in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 60:63-73.
- Hwang SY, Park YK, Koo HC, Park YH. 2010. spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. *J Vet Sci.* 11:125-131.
- Jefferson KK, Cramton SE, Götz F, Pier GB. 2003. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the ica locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol.* 48:889-899.
- Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P, Höök M. 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol.* 18:211-23.

- Jones C. 2005. Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. *Carbohydr Res.* 340:1097-1106.
- Jönsson K, Signäs C, Müller HP, Lindberg M. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem.* 202:1041-1048.
- Jonsson P, Lindberg M, Haraldsson I, Wadstrom T. 1985. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect Immun.* 49:765-769.
- Kagan JC, Medzhitov R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls toll-like receptor signaling. *Cell.* 125:943-955.
- Karakawa W, Fournier J, Vann W, Arbeit R, Schneerson R, Robbins J. 1985. Method for the Serological Typing of the Capsular Polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Micr.* 22:445-447.
- Kauf AC, Vinyard BT, Bannerman DD. 2007. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Res Vet Sci.* 82:39-46.
- Keller ET, Wanagat J, Ershler WB. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1:340-357.
- Kiedrowski MR, Horswill AR. 2011. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N.Y Acad Sci.* 124:104-121.
- Kim Y, Atalla H, Mallard B, Robert C, Karrow N. 2011. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res.* 7:51-63.

- Klein RC, Fabres-Klein MH, Brito MA, Fietto LG, Ribon Ade O. 2012. Staphylococcus aureus of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.*160:183-188.
- Kloos WE, Schleifer K, Genus IV.1986. Staphylococcus, in *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, M.N.S. Sneath P.H.A., Sharpe M.E., Holt J.G., Editor. Williams and Wilkins Co.: Baltimore. 1013-1035.
- Knowles D. 2001. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. En *Neoplastic hematopathology*, Knowles D Lippincott W.W. Philadelphia. 3:93 -226.
- Kolek O, Gajkowska B, Godlewski MM, Motyl T. 2003. Antiproliferative and apoptotic effect of TGF-beta 1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 134:417-430.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. Interleukin 17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 27:485-517.
- Kumar R, Yadav BR, Dev K, Singh RS. 2008. Simple protocol for DNA extraction from Staphylococcus aureus. [http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-Simple-Protocol-for-DNA-Extraction-from-Staphylococcus aureus-4999](http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-Simple-Protocol-for-DNA-Extraction-from-Staphylococcus-aureus-4999).
- Kwong KY, Literat A, Zhu NL, Huang HH, Li C, Jones CA, Mino P. 2004. Expression of transforming growth factor beta (TGF-beta1) in human epithelial alveolar cells: A pro-inflammatory mediator independent pathway. *Life Sci.* 74:2941-2957.
- Lahouassa H, Moussay E, Rainard P, Riollot C. 2007. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Cytokine.* 38:12-21.
- Landmann R, Knopf HP, Link S, Sansano S, Schumann R, Zimmerli W.1996. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun.*64:1762-1769.

- Lanier LL. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 23:225-274.
- Lara-Zárate L, Lopez-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A. 2011. Staphylococcus aureus inhibits nuclear factor kappa B activation mediated by prolactin in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog.* 51:313-318.
- Larone DH. 1993. Procedure for identification of yeast. In *Medically important fungi. A guide to identification.* Larone D.H. (Ed), American Society for Microbiology, Washington DC. 182
- Larriestra A, Vissio C. 2012. Mastitis: pérdidas económicas, frecuencia y variantes de la enfermedad. .Cuántos \$\$ se lleva la mastitis? *Producir XXI Bs. As.* 20:28-32.
- Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol.* 85:61-67.
- Le Maréchal C, S.N., Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, Azevedo V, François P, Schrenzel J, van de Guchte M, Even S, Berkova N, Thiéry R, Fitzgerald JR, Vautor E, Le Loir Y. 2011. Molecular basis of virulence in Staphylococcus aureus mastitis. *PLoS One.* 6:27354.
- Lee J, Takeda S, Livolsi P, Paoletti L. 1993. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by Staphylococcus aureus. *Infect Immun.* 61:1853-1858.
- Lee NY, Kawai K, Nakamura I, Tanaka T, Kumura H, Shimazaki K. 2004. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. *J Vet Med Sci.* 66:1267-1269.
- Lee JW, Bannerman DD, Paape MJ, Huang MK, Zhao X. 2006. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with Escherichia coli or Staphylococcus aureus by real-time PCR. *Vet Res.* 37:219-229.

- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A, 2000: Milk leukocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J. Vet. Med.* 47:581–589.
- Leitner G, Eligulashvily R, Krifucks O, Perl S, Saran A. 2003. Immune Cell Differentiation in Mammary Gland Tissues and Milk of Cows Chronically Infected with *Staphylococcus aureus*. *J Vet Med.* 50:45-52.
- Letterio JJ, Roberts AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol.* 16:137-161.
- Lewandowska-Sabat AM, Boman GM, Downing A, Talbot R, Storset AK, Olsaker I. 2013. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus* in vitro. *BMC Genomics.* 14:891.
- Lippolis JD, Reinhardt TA, Goff JP, Horst RL. 2006. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. *Vet Immunol Immunopathol.* 113:248-255.
- Liuzzi GM, Latronico T, Fasano A, Carlone G, Riccio P. 2004. Interferon- β inhibits the expression of metalloproteinases in rat glial cell cultures: implications for multiple sclerosis pathogenesis and treatment. *Mult Scler.* 10:290-297.
- Low DKR, Freer JH, 1977. The purification of β -lysin (sphingomyelinase C) from *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2:139-143.
- Lowy FD. 1988. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 339:520-532.
- Lundberg A, Aspán A, Nyman A, Unnerstad HE, Waller KP 2014. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Acta Vet Scand.* 8:56-62.
- Maier R, Schmid P, Cox D, Bilbe G, McMaster GK. 1991. Localization of transforming growth factor- β 1, - β 2 and - β 3 gene expression in bovine mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 82:191-198.

- Maira-Litran T, Kropec A, Joyce J, Mark G, Goldmann DA, Pier GB. 2002. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun.* 70:4433-4440.
- Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Van Kampen CL, Wagter L, Wilkie BN. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci.* 81:585-595.
- Mamo W, Froman G, Muller HP. 2000. Protection induced in mice vaccinated with recombinant collagen-binding protein (CnBP) and alpha-toxoid against intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 44:381-384.
- Marshall KC, Stout R, Mitchell R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces, *J Gen Microbiol* 68:337-348.
- Martin FJ, Gomez MI, Wetzel DM, Memmi G, Maghnus O'S, Song G, Shier C, Prince A. 2009. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J Clin Invest.* 119:1931-1939.
- Martineau, F Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 36:618-623.
- Massague J, Gomis RR. 2006. The logic of TGF- β signaling. *FEBS Lett.* 580:2811-2820.
- Massey RC, Fowler T, Day NPJ, Schofield K, Wann ER, Berendt AR, Hook M, Peacock SJ. 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cellular Microbiology.* 3:839-851.
- Maxe I, Rydén C, Wadström T, Rubin K. 1986. Specific attachment of *Staphylococcus aureus* to immobilized fibronectin. *Infect Immun.* 54:695-704.

- McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Hook M. 1997. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 247:416-424.
- Mehrzad J, Duchateau L, Burvenich C. 2005. High milk neutrophil chemiluminescence limits the severity of bovine coliform mastitis. *Vet Res.* 36:101-116.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection. *Vet J.* 171:398-407.
- Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. 2007. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet Microbiol.* 125:141-149.
- Melchior MB, van Osch MH, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2009. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol.* 137:83-89.
- Melchior MB, van Osch MH, Lam TJ, Vernooij JC, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J Dairy Sci.* 94:5926-5937.
- Menzies P, Ramanoon S. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 17:333-358.
- Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI. 2010. Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells. *Autophagy.* 6:110-125.
- Milanov D, Lazic S, Vidic B, Petrovic J, Bugarski D, Seguljev Z. 2010. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Vet-Beograd.* 60:217-226.

- Miles AA, Misra SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)*. 38:732-749.
- MinAgri. 2013. Subsecretaría de Lechería Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Precio promedio de la leche cruda informado por la industria. Diciembre 2013.
http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/06_precio%20al%20productor/_archivos/060000_Precio_Productor_2013.pdf
- Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. 2004. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: Putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15:61-76.
- Montesino I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. 2002. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 40:2119–2125.
- Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci* 90:1176-1185.
- Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, Vaudaux P. 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun*. 63:4738-4743..
- Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. 2005. *Microbiología Médica*. Elsevier Inc. Madrid. 3:11-24
- Musters S, Coughlan K, McFadden T, Maple R, Mulvey T, Plaut K. 2004. Exogenous TGF-beta1 promotes stromal development in the heifer mammary gland. *J Dairy Sci*. 87:896-904.
- Nagahata H, Kawai H, Higuchi H, Kawai K, Yayou K, Chang CJ. 2011. Altered leukocyte responsiveness in dairy cows with naturally occurring chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Med Sci*.73:885-894.

- Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. 2005. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem.* 280:5491-5495.
- Nanra JS, Timofeyeva Y, Buitrago SM, Sellman BR, Dilts DA, Fink P, Nunez L, Hagen M, Matsuka YV, Mininni T, Zhu D, Pavliak V, Green BA, Jansen KU, Anderson AS. 2009. Heterogeneous in vivo expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*: implications for vaccine design. *Vaccine* 27:3276-3280.
- Nash D, Rogers G, Cooper J, Hargrove G, Keown J. 2003. Heritability of intramammary infections at first parturition and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *J Dairy Sci.* 86:2684-2695.
- National Mastitis Council. 1996. *Current Concepts in Bovine Mastitis*. National Mastitis Council, Madison, Wisconsin, EE.UU.
- Ní Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 30:245-257.
- Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS. 2007. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost.* 98:488-496.
- Notebaert S, Meyer E. 2006. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis. *Vet Q.* 28:2-13.
- O'Gara JP. 2007. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 270:179-88
- Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 118:133-140.

- Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Vilela CL. 2011. Invasive potential of biofilm-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. *J Vet Sci* 12:95-97.
- Oliver S P, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality; 4th Edition, The National Mastitis Council, Verona, Wisconsin, EE.UU.
- Oliver SP. 1988. Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. *Am J Vet Res* 49:1789-1793.
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. 2006. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 57:450-460.
- O'Neill E, Pozzi C, Houston P, Smyth D, Humphreys H, Ashley R, O'Gara J. 2007. Association between Methicillin susceptibility and Biofilm Regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device – related infections. *J Clin Microbiol.* 45:1379-1388.
- O'Riordan K, Lee J. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 17:218-234.
- Ote I, Taminiu B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 153:285-292.
- Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:207-228.
- Otto M. 2010. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 7: 555-567.
- Paape MJ, Lilius E, Wiitanen P, Kontio M, Miller RH. 1996. Intramammary defense against infectious induced by *Escherichia coli* in cows. *Am J Vet Res.* 57:477-482.

- Paape MJ, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 7:109-121.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34:597-627.
- Pahissa A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Primera edición. ICG Marge, SL Ed. Barcelona, España.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC, 1992: Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.* 75: 998–1006.
- Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies CJ. 2004. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J Vet Sci.* 5:29-39.
- Parsek MR, Singh PK. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:677:701.
- Paterson GK, Morgan FJ, Harrison EM, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA. 2014. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.* 69:598-602.
- Pattison IH. 1958. The progressive pathology of bacterial mastitis. *Vet Rec.*70:114–117.
- Pavel BA, Vasile C. 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics.* 13:9.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 70:4987-4996.

- Peña J, Uffo O. 2013. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. *Rev. Salud Anim.* 35:189-196.
- Persson K, Colditz IG, Flapper P, Franklin NAF, Seow HF. 1996. Cytokine-induced inflammation in the ovine teat and udder. *Vet Immunol Immunopathol.* 53:73-85.
- Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR. 2013. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect.* 19:16-22.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Yang W, Seyfert HM, Nürnberg G, Schuberth HJ. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res.* 39:18.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 26:509-515.
- Philpot WN, Nickerson SN. 1992. Mastitis: el contra ataque. Una estrategia para combatir la mastitis. Estados Unidos: BabsonBros Co. 147-234.
- Philpot WN, Nickerson SN. 2000. Importancia económica de la mastitis. Ganando la lucha contra la mastitis. Westfalia-Surge. Estados Unidos de América. 1-13, 44-

- Piccinini R, Borromeo V, Zecconi A. 2010. Relationship between *Staphylococcus aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet Microbiol.* 145:100-105.
- Piccinini R, Tassi R, Daprà V, Pilla R, Fenner J, Carter B, Anjum MF. 2012. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res.* 28:1-7.
- Plattner BL, Hostetter JM. 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet Med Int.* 214384:1-8.
- Pohlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser K, Doring G, Lee J, Fournier J, Botzenhart K, Wolx C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells. Influence of the capsular polyaccharide, the global regulator agr and the bacterial growth phase. *Infect Immun.* 68:4865-4871.
- Poutrel B, Gilbert F, Lebrun M. 1995. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2:166-171.
- Prince LR, Graham KJ, Connolly J, Anwar S, Ridley R, Sabroe I, Foster SJ, Whyte MK. 2012. *Staphylococcus aureus* induces eosinophil cell death mediated by α -hemolysin. *PLoS One.* 7:31506.
- Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1994. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1:509-516.
- Pyörälä SH, Pyörälä EO. 1998. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc.* 212:407-412.
- Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RS, Teixeira LM, Castro AC. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 88:3211-3219.

- Rainard P, Riollat C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* 37:369-400.
- Ramesh A, Padmapriya B, Chrashekar A, Varadaraj M. 2002. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cell Probes.* 16:307-314.
- Rasmussen R. 2001. Quantification on the LightCycler, in *Rapid Cycle Real-Time PCR.* Springer Berlin Heidelberg. 21-34.
- Reinoso EB, Betterra S, Odierno L, Bogni C. 2007. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. *Vet Res Anim Sci.* 40:115-121
- Reinoso EB, El-Sayed, A, Lammler C, Bogni C, Zschock M. 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol Res.* 163:314-322.
- Renna MS, Pereyra EA, Baravalle C, Camussone CM, Dallard BE, Marcipar IS, Calvino LF. 2014. Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiol Lett.* 360:62-69.
- Restrepo J, Ortiz L, Cardon X, Olivera M. 2012. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular del *Staphylococcus aureus* en leche de vacas afectadas por mastitis. *Biosalud.* 11:40-51.
- Reza G. 2000. Mastitis bovina su reconocimiento clínico, programas de prevención y su terapia con antimastíticos a base de cefapirinas. *Mastitis bovina su reconocimiento clínico.* México D. F. 1-13.
- Riollat C, Rainard P, Poutrel B. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Biol Mamm Gland.* 480:247-258.

- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci.* 84:1077-1084.
- Rivas AL, Tadevosyan R, Quimby FW, Lein DH. 2002. Blood and milk cellular immune responses of mastitic non-periparturient cows inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res.* 66:125-131.
- Roberson J. 1999. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* on Dairy Farms, in National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. 38.
- Rossitto PV, Ruiz L, Kikuchi Y, Glenn K, Ruiz K, Watts JL, Cullor JS. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J Dairy Sci.* 85:132-138.
- Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, Chan WC, Williams P, O'Gara JP, Massey RC. 2012. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J Infect Dis.* 205:798-806.
- Sánchez MS, Ford CW, Yancey Jr RJ. 1994. Efficacy of tumor necrosis factor-alpha and antibiotics in therapy of experimental murine staphylococcal mastitis. *J Dairy Sci.* 77:1259-1266.
- Saran A, Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Ed. Inter-Médica SAICI. 1: 9-14, 49-62, 99-108, 125-132.
- Sauer Karin. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation, *Genome Biology*, 4: 219.
- Schaffer AC, Lee JC. 2008. Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 1:71-78.
- Schennings T, Heimdahl A, Coster K, Flock JI. 1993. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microb Pathog.* 15:227-236.

- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144:270-89.
- Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. 2005. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol.* 42:495-499.
- Sears PM, McCarthy KK. 2003. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19:171-185.
- Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas DS. 1992. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 176:1091-1098.
- Shafer-Weaver KA, Sordillo LM. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 79:1347-1352.
- Shafer-Weaver KA, Sordillo LM. 1997. Bovine CD8C suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet Immunol Immunopathol.* 56:53-64.
- Shafer-Weaver KA, Corl CM, Sordillo LM. 1999. Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J Dairy Sci.* 82:1696-1706.
- Shalm OW, Carroll EJ, Jain NC. 1971. *Bovine Mastitis.* Lea & Febiger, Philadelphia, EE.UU. 360.
- Shompole S, Henon KT, Liou LE, Dziewanowska K, Bohach G, Bayle KW. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol Microbiol.* 49:919-927.

- Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Kreiswirth BN. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.* 37:3556-3563.
- Shoshani E, Leitner G, Hanochi B, Saran A, Shpigel NY, Berman A. 2000. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J Dairy Res.* 67:155-169.
- Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol.* 1:101-117.
- Sinha B, Fraunholz M. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int J Med Microbiol.* 300:170-175.
- Skyberg JA, Thornburg T, Rollins M, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW. 2011. Murine and bovine $\gamma\delta$ T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. *PLoS One.* 6:21978.
- Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci.* 68:1531-1553.
- Smith KL, Hogan JS. 1993. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9:489-498.
- Smith KL, Hogan JS. 1997. Risk factors for environmental streptococcal intramammary infections. *Proc. Symp. Ontario Veterinary College, Canada.* Junio 2:42-50.
- Smulski S, Kaczmarowski ME, Lassa H. 2011. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. *Medycyna Weterynaryjna.* 67:190-193.

- Smyth DS, Meaney WJ, Hartigan PJ, Smyth CJ. 2007. Occurrence of *ssl* genes in isolates of *Staphylococcus aureus* from animal infection. *J Med Microbiol.* 56:418-425.
- Sohn EJ, Paape MJ, Peters RR, Fetterer RH, Talbot NC, Bannerman DD. 2004. The production and characterization of anti-bovine CD14 monoclonal antibodies. *Vet Res.* 35:597-608.
- Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC. 1999. Cutting edge: a dominant negative form of TNF- α converting enzyme inhibits TNF and TNFRII secretion. *J Immunol.* 63:4105-4108.
- Soltys J, Quinn MT. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect Immun.* 67:6293-6302.
- Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa W, Vann W, Schneerson R, Malik Z. 1985. Encapsulation and capsular types in isolated of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol.* 22: 828-834.
- Sordelli D, Buzzola F, Gomez M, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz A, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee J. 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol.* 38:846-850.
- Sordillo LM, Streicher KL. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7:135-146.
- Sordillo LM. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Prod Sci.* 98:89-99.
- Spencer GR. 1949. The significance of hypersensitivity in bovine mastitis as determined by a study of its pathogenesis. Thesis. Univ. of Wisconsin. Madison, WI.

- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56:187-209
- Stepanovic S, Vukovic D, Holav, Bonoaventura, G, Djukic S, Cirrovic Ivana, Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *J Comp APMIS.* 115:891-899.
- Ster C, Gilbert FB, Cochard T, Poutrel B. 2005. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. *Mol Cell Probes.* 19:227-235.
- Strandberg Y, Gray C, Vuocolo T, Donaldson L, Broadway M, Tellam R. 2005. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine.* 31:72-86.
- Stringfellow W, Dassy B, Lieb M, Fournier J. 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl Environ Microbiol.* 57:618-621.
- Sutra L, Rainard P, Poutrel B. 1990. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J Clin Microbiol.* 28:2253-2258.
- Sutra L, Poutrel B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 40:79-89.
- Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. 2012. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Pol J Microbiol.* 61:65-69.
- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 17:1-14.

- Tang J, Chen J, Li H, Zeng P, Li J. 2013. Characterization of adhesin genes, Staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among Staphylococcus aureus strains isolated from different sources. *Foodborne Pathogens Dis.* 10:753-763.
- Taponen S, Jantunen A, Pyörälä E, Pyörälä S. 2003. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Acta Vet Scand.* 44:53-62.
- Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, Scott JL. 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8C. *Cell Immunol.* 156:245-253.
- Taylor BC, Keefe RG, Dellinger JD, Nakamura Y, Cullor JS, Stott JL. 1997. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol.* 182:68-76.
- Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 89:2542-2551.
- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33:2233-2239.
- Thornsberry C. 1985. Automated procedures for antimicrobial susceptibility test. In: E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr., and Shadomy (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1015-1018.
- Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engebretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T. 2011. Staphylococcus aureus biofilms

- prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol.* 186:6585-6596.
- Todar K. 2011. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Dep. de Bacteriología. Univ. de Wisconsin, Madison, Wisconsin.1-6.Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penades JR, Lasa I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 67: 4538-4545.
- Tollersrud T, Kenny K, Reitz A, Lee J. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus* and others *Staphylococcus* sp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol.* 38:2998-3003.
- Tollersrud T. 2001. *Staphylococcus aureus* mastitis. Bacterial characteristics and host immune responses. Thesis of Doctor Medicinae Veterinariae. National Veterinary Institute. Oslo. 9.
- Tracey KJ. 1994. Tumor necrosis factor- α . En: *The cytokine handbook*, Ed. 2^a, San Diego C.A., Academic Press. 289-300.
- Trigo G, Dinis M, França A, Bonifácio Andrade E, Gil da Costa RM, Ferreira P, Tavares D. 2009. Leukocyte populations and cytokine expression in the mammary gland in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Med Microbiol.* 58:951-958.
- Tuchscher LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Carrari R, Lee J, Sordelli D. 2005. Capsule-negative *S. aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infect Immun.* 73:7932-7937.
- Tuchscher LP, Gomez M, Buzzola F, Calvinho L, Lee J, Sordelli D. 2007. Characterization of a new variant of IS257 prevalent among bovine isolates of *Staphylococcus aureus* in Argentina. *Infect. Immun.* 75:5483-5488.

- Tuchscher LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Lee JC, Sordelli DO. 2008. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun.* 76:5738-5744.
- Tuchscher LP, Loffler B, Buzzola FR, Sordelli DO. 2010. *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiol.* 5:1823-1832.
- Turutoglu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. *Vet Res Commun.* 33:945-956.
- Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C, Trotonda P, Foster TJ, Lasa I, Penades JR. 2003. *Sip*, and integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49:193-210.
- Valihrach L. 2012. Impact of normalization method on experimental outcome using RT-qPCR in *Staphylococcus aureus* *J Microbiol Meth.* 90:214-216.
- Valle J, Toledo-Arana A, Berasain C, Ghigo JM, Amorena B, Penades JR, Lasa I. 2003. *SarA* and not σB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48:1075-1087.
- Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 15:294-309.
- Van de Peer Y, De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Appl Biosci.* 10:569-70.
- Van Duijkeren E, Hengeveld PD, Albers M, Pluister G, Jacobs P, Heres L, van de Giessen AW. 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. *Vet Microbiol.* 171:364-367.

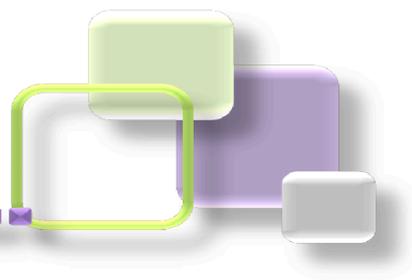
- Van Kampen C, Mallard BA. 1997. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet Immunol Immunopathol.* 59:79-91.
- Vandesompele J, KM, Pfaffl MW. 2009. Reference gene validation software for improved normalization., in *Real Time PCR: Current Technology and Applications*, J. Logan, Edwards,K.,Saunders,N, Editor. Caister Academic Press: London. p. 47–64.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3:34.
- Vasudevan P. Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 92:179-185.
- Vautor E, Abadie G, Pont A, Thiery R. 2008. Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet Microbiol.* 127:407-411.
- Vautor E, Le Marechal C, Le Loir Y, Chevalier M, Robinson AD, Thiery R, Lindsay J 2009. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. *Vet Res.* 40:56.
- Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor K, Lina G, Vandenesch F, Fattom A, Etienne J. 2007. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J Clin Microbiol.* 45:725-729.
- Vesterholm-Nielsen M, Olhom Larsen M, Elmerdahl Olsen J, Aarestrup FM. 1999. Occurrence of the *bla_Z* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. *Acta Vet. Scand.* 40:279-286.
- Vieira-da-Motta O, Folly MM, Sakyiama CCH. 2001. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Braz J Microbio.* 32:27-31.

- Waarnker R, Isaacson P. 2001. Immunohistochemical analysis of lymphoid tissue. En Neoplastic hematopathology. Knowles D. Lippincott W.W. Philadelphia. 4:227-253.
- Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut, S. 2000. IFN- β -1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN- β -1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol.* 165:548-557.
- Watanabe I, Ichiki M, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. 2007. TLR2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages: a novel bacterial strategy against host innate immunity. *J Immunol.* 178:4917-4925.
- Wattiaux M. 2001. Mastitis: The disease and its transmission. Dairy essentials: nutrition and feeding, reproduction and genetic selection, lactation and milking, raising dairy heifers. Babcock Institute for International Dairy Research and Development. Univ. de Wisconsin-Madison. 23:89-92.
- Watts JL. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 16:41-66.
- Watts JL, Salmon SA. 1997. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase. *J Dairy Sci.* 80:788-791.
- Welleberg G, Van Der Poel W, Van Oirschot J. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Vet Microbiol.* 236:1-21.
- Wellnitz O, Bruckmaier RM. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Vet J.* 192:148-152.
- Werling D, Piercy J, Coffey TJ. 2006. Expression of Toll-like receptors by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination. *Vet Immunol Immunopathol.* 112:2-11.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific

- changes in innate immune gene expression. *Vet Immunol Immunopathol.* 140:181-189.
- Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U. 2002. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun.* 70:2758-2762.
- Woods A, Ellis CR. 1994. *Laboratory Histopathology. A Complete Reference.* Longman Group Limited. London. 4:1-6.
- Yamanaka H, Hisaeda K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai, H. 2000. ELISA for bovine interleukin-1 receptor antagonist and its application to mastitic sera and whey. *J Vet Med Sci.* 62:661-664.
- Yang W, Molenaar AJ, Kurts-Ebert B, Seyfert HM. 2006. NF- κ B factors are essential, but not the switch, for pathogen-related induction of the bovine-defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. *Mol Immunol.* 43:210-225.
- Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schubert HJ, Seyfert HM. 2008. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in mammary epithelial cells and to quickly induce TNF- α and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol.* 45:1385-1397.
- Yokoyama R, Itoh S, Kamoshida G, Takii T, Fujii S, Tsuji T, Onozaki K. 2012. Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to the Toll-like receptor 2 extracellular domain and inhibits cytokine production induced by *Staphylococcus aureus*, cell wall component, or lipopeptides in murine macrophages. *Infect Immun.* 80:2816-2825.
- Young-Duck L, Park J, Chang H, Kim WJ. 2007. Expression of Enterotoxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates Based on mRNA Analysis. *J Microbiol Biotechnol.* 17:461-467.

- Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Luengo JM, Naharro G. 2001. Identification of *Staphylococcus* spp. By PCR-Restriction fragment length polymorphism of gap gene. *J Clin Microbiol.* 39:3693-3695.
- Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Gröhn YT, Schukken YH. 2001. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci.* 84:590-599.
- Zadoks RN. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. 239:2-3.
- Zarzynska J, Gajewska M, Motyl T. 2005. Effects of hormones and growth factors on TGF-beta1 expression in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Res.* 72:39-48.
- Zecconi A, Binda E, Borromeo V, Piccinini R. 2005. Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates or somatic cell counts. *J Dairy Res.* 72:203-208.
- Zecconi A, Calvinho LF, Fox KL. 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *IDF. Bulletin* 408:1-36.
- Zecconi A, Scali F. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunol Lett.* 150:12-22.
- Zhang H, Issekutz AC. 2002. Down-regulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor. *Am J Pathol.* 160:2219-2230.
- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 86:57-65.
- Zhu J, Yamane H, Paul WE. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 28:445-489.

8. ANEXOS



Anexo I: Medios de cultivo y soluciones**Aislamiento:**

Caldo tripteína soya (Britania): tripteína 1,7% P/V; peptona de soya 0,3% P/V; NaCl 0,5% P/V; K_2HPO_4 0,25% P/V; glucosa 0,25% P/V (pH $7,3 \pm 0,2$). Se esterilizó el medio en autoclave 20 minutos a 15 psi (1,05 Kg/cm²)

Agar tripteína soya (Britania): tripteína 1,5% P/V; peptona de soya 0,5% P/V; NaCl 0,5% P/V; agar 1,5% P/V (pH $7,3 \pm 0,2$). Se esterilizó en autoclave 20 minutos a 15 psi. Nota: Si se pesa exacto no es necesario ajustar el pH del medio

Agar Salado: Agar Base, NaCl 2,5% % (p/v)

Caracterización Fenotípica:

Agar manitol salado (AMS): extracto de carne 0,1% P/V; pluripeptona 1% P/V; d-manitol 1%P/V; NaCl 7,5% P/V; agar 1,5% P/V; rojo fenol 0,0025% P/V (pH $7,4 \pm 0,2$). Se autoclavó 20 min a 15 psi. Nota: Si se pesa exacto no es necesario ajustar el pH del medio.

Agar sangre: Agar Base (tripteína 1,5% P/V; peptona de soya 0,5% P/V; NaCl 0,5% P/V; agar 1,5% P/V (pH $7,3 \pm 0,2$). Se esterilizó en autoclave 20 minutos a 15 psi. Luego a los 55° del Agar base se le añade Sangre bovina 5 % (v/v).

Prueba de Voges-Proskauer

- Reactivo A: α -naftol 5 g; etanol absoluto 100 ml.
- Reactivo B: NaOH 40 g, agua destilada, 100 ml.
- Medio de cultivo: Peptona 7g/litro; D (+) Glucosa 5g/litro; K_2PO_2 5g/litro; agua destilada 100ml. Se disuelven completamente en agua destilada. Se distribuye en tubos de 3ml, se esteriliza en autoclave (15min a121°C). Valor del ph del medio de cultivo listo para su uso, a 37°C; 6,9+/- 0,1.

Ensayo en placa para producción de biofilm: Caldo tripteína soya; CTS con 1% glucosa; buffer fosfato salino (PBS; pH 7,2); cristal violeta 2% ; solución de

etanol 95%; placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (GBO); espectrofotómetro (SPECTROstar^{Nano} BMG LABTECH).

Caracterización molecular:

Extracción de ADN genómico:

- Tris-HCl 10 mM (pH 8): Tris base 12,1% P/V. Se autoclavó 20 minutos a 15 psi. Nota: El pH se ajustó con HCl concentrado.
- Lisozima: 2,5% P/V. Nota: Se llevó a volumen final con agua Milli-Q estéril
- Buffer de lisis (pH 8): Tris-HCl 50 mM; 1% P/V SDS; 100 mM EDTA. Se autoclavó 20 minutos a 15 psi. Nota: El pH se ajustó con HCl concentrado
- Proteinasa K: 2% P/V. Nota: Se llevó a volumen final con agua Milli-Q estéril
- Fenol - Cloroformo: Se realizó una mezcla 1:1
- Cloroformo - Alcohol Isoamílico: Se realizó una mezcla 24:1
- Etanol: 70% V/V; 95% V/V. Nota: Se llevó a volumen final con agua Milli-Q estéril
- NaCl 5M: Se autoclavó 20 minutos a 15 psi (1,05 Kg/cm²)

Cuantificación de ADN:

- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 20 (Perkin Elmer)
- Cubeta para espectrofotómetro de cuarzo (Sigma Aldrich)

Amplificación de un fragmento específico de *Staphylococcus aureus* por PCR:

- dNTP 25 mM: Mezcla equimolar de dGTP, dTTP, dATP, dCTP (Productos Bio-Lógicos)
- MgCl₂ 25 mM (Productos Bio-Lógicos)
- Oligonucleótidos 10 μM (Invitrogen)
- Buffer 5X con MgCl₂ 7,5 mM (Promega)
- Taq pol 5U (Promega)
- Agua Milli-Q estéril. Nota: Se autoclavó 20 minutos a 15 psi

Electroforesis en geles de agarosa:

- Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X: Tris base 2 M, EDTA (pH 8) 50 mM, ácido acético 5,71% V/V
- Buffer TAE 1X: Se preparó a partir de una dilución 1/50 de TAE 50X
- Bromuro de Etidio: 1% P/V (Biodynamics)
- Agarosa: 1% P/V; 2% P/V; 3%. Nota: Se llevó a volumen final con buffer TAE 1X

Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE):

- Buffer PIV: NaCl 1 M; Tris-HCl (pH 8) 10 mM. Se autoclavó 20 minutos a 15 psi.
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMA): 1,5% P/V (Bio Rad). Nota: Se llevó a volumen final con buffer PIV.
- Buffer EC: Tris-HCl (pH 8) 6 mM; NaCl 1 M; EDTA (pH 8) 100 mM; Deoxicolato de sodio 0,2%; laurilsarcosina de sodio 0,5%; Brij-58 0,5%. Se autoclavó 20 min. a 15 psi.
- Buffer EC-Lisis: Buffer EC 1X; ARNasa A 5µg/mL; Lisozima 100µg/mL; Lisostafina 10µg/mL.
- Buffer ES: EDTA (pH 9) 0,5 M; Laurilsarcosina de sodio 0,5% P/V. Se autoclavó 20 min. a 15 psi.
- Buffer ES-P: Buffer ES 1X; Proteinasa K 0,05%P/V.
- Buffer TE: Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM; EDTA(pH 8) 1 mM. Se autoclavó 20 min. a 15 psi.
- Buffer Pre-SmaI 1X: Tris-HCl (pH 8) 6 mM; MgCl₂·6H₂O 6mM; KCl 20 mM. Se autoclavó 20 min. a 15 psi.
- Mezcla de restricción: Buffer Pre-SmaI 1X; 15 U/plug de SmaI.
- Buffer loading 6X: Glicerol 30% V/V; Azul de bromofenol 0,25% V/V.
- Buffer TBE 10X: Tris base 890 mM; Ácido Bórico 890 mM; EDTA (pH 8) 20 mM. Se autoclavó 20 min. a 15 psi.
- Buffer TBE 0,5X: Se preparó a partir de una dilución 1/20 del TBE 10X.
- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda 20 (Perkin Elmer).
- Cubeta para espectrofotómetro de plástico (Sigma Aldrich).

- Agarosa calidad PFGE 1%P/V (BioRad). Nota: Se llevó a vol. final con buffer TBE 0,5X.
- Marcador de peso molecular: Lambda Ladder PFGE Marker (New England, BioLabs)
- Bromuro de Etidio (BrEt): 1%P/V (Biodynamics).
- Sistema de PFGE: CHEF DR-III (Bio-Rad).
- Software para filogenia: Treecon para Windows

Evaluación de los niveles de expresión de genes de adherencia de S. aureus:

Ensayos de internalización celular:

- Medio D-MEM (450 ml):
10% de Suero Fetal Bovino de complementado: 50 ml
5 µg/ml hidrocortisona: 1 vial
5 µg/ml insulina bovina: 1 vial
Suplementado con:
Glutamina 200 mM: Concentración final 2 mM
Gentamicina 40 µg/ml: Concentración final 40 µg/ml
Fungizone: 1% V/V
Nota: Llevar a pH con HCl 2%
- PBS 10X (1L): NaH₂PO₄ (Sigma) 3,53 g; Na₂HPO₄ (Merck x 2 H₂O) 25g; NaCl (Cicarelli) 85 g. Para PBS 1X diluir 1/10 esta preparación con agua Milli-Q estéril.
- Tripsina 0,25%-EDTA 0,1% (Gibco BRL)
- Tritón X-100 (Amersham)

Retrotranscripción:

- Random Primers 3 µg/µl (Invitrogen): Se realizó una dilución 1/3 con agua DEPC hasta concentración final 1µg/µl.
- dNTP 25 mM (Invitrogen): Mezcla equimolar de dATP, dTTP, dCTP y dGTP.
- Enzima de retrotranscripción M-MLV 200 U (Invitrogen)
- Buffer M-MLV 5X (Invitrogen)

- DTT 100 mM (Invitrogen)
- RNA out 400 U/ul (Invitrogen)
- Termociclador TECHNE TC-312 (Stone, Reino Unido)

Evaluación del gen estándar interno para PCR Real Time:

Amplificación mediante oligonucleótidos pre-seleccionados:

- Termociclador StepOne v2.1 (Applied Biosystem)
- Mezcla Real 5X (Biodynamics): Concentración final 1X
- Oligonucleótidos (Invitrogen): Resuspendidos en agua Milli-Q estéril para lograr concentración 40 μ M. Concentración final de uso: 0,4 μ M
- Agua Milli-Q: Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 psi

Curvas de crecimiento de S. aureus:

- Agar Tripteína Soya (ATS)
- Caldo Tripteína Soya (CTS)
- PBS 1X.: Preparado de una solución concentrada 10X con agua Milli-Q estéril

Ensayos de internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).

Tabla 1: Efecto del tamaño del inóculo en los porcentajes de internalización de *S. aureus* en células MAC-T. Los datos corresponden a un experimento representativo realizado por triplicado. Los porcentajes de internalización se expresan como el número de UFC recuperadas dentro de las MAC-T/número de UFC presentes en el inóculo infectante X 100.

Relación bacteria: célula MAC-T (MOI)	% internalización ± DE CEPA 358	% internalización ± DE CEPA 61
300: 1	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1
200: 1	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,2
100: 1	2,2 ± 0,1	4,2 ± 0,3
50: 1	0,9 ± 0,7	0,8 ± 0,5
20: 1	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,3

Tabla 2: Origen y características epidemiológicas de las cepas clínicas de *S. aureus* seleccionadas.

N° de Cepas	Tambo	Prevalencia	RCS	Datos adicionales
17	San Justo, Santa Fe (tambo N° 5 de Tregar)	62%	525.000cél/ml	Elevada difusión en el rodeo. Se aisló el mismo microorganismo con idéntico pulsotipo al PFGE a partir de 3 muestras al azar tomadas el mismo día en diferentes animales con signos de la enfermedad
358	Buenos Aires	<10%	350.000 cél/ml	
48	San Justo, Santa Fe (tambo N° 11 de Tregar)	7%	279.000cél/ml	
61	Santa Fe	-	-	
247	Córdoba	-	-	
364	Buenos Aires	62%	591.000 cél/ml	
110	Rafaela, Santa Fe (tambo sucesores JC Armando)	17%	450.000 cél/ml	
14	San Justo, Santa Fe (tambo N° 2 de Tregar)	4%	395.000 cél/ml	
322	Río IV, Córdoba	-	-	
117	Freyre, Córdoba	62%	591.000 cél/ml	
293	Romage Laguna Córdoba	-	-	
25	Rafaela, Santa Fe (tambo de Williner)	<10%	350.000 cél/ml	
133	Gdor. Gálvez, Santa Fe	-	-	
3	Rafaela, Santa Fe (tambo de Williner)	<10%	350.000 cél/ml	
8	San Justo, Santa Fe (tambo N° 7 de Tregar)	70%	591.000 cél/ml	

Tabla 3: Origen y características epidemiológicas de las cepas subclínicas de *S. aureus* seleccionadas.

N° de Cepas	Tambo	Prevalencia	RCS	Datos adicionales
1595	Roca, Santa Fe	18 %	450.500 cél/ml	Muestras pre y post-tratamiento con antibióticos (enrofloxacin) dieron positivas a <i>S. aureus</i> y el mismo pulstipo al PFGE. Se aisló 3 veces consecutivas del mismo cuarto mamario en un periodo de 6 meses.
316	Santa Fe (Tambo EEA Rafaela INTA)	1-3 %	400.000 cél/ml	Proviene de un animal inmunizado con una mezcla de proteínas recombinantes de <i>S. aureus</i> . Se detectó a los 15 días post parto y se aisló del mismo cuarto mamario hasta el final de la lactancia.
5128	Santa Fe (Tambo EEA Rafaela INTA)	1-3 %	400.000 cél/ml	Proviene de un animal inmunizado con lisado de <i>S. aureus</i> . Se detectó 2 meses postparto en cuarto PD y a los 6 meses en cuartos AD y PI. Los 3 cuartos se mantuvieron infectadas hasta el fin de la lactancia presentando idéntico pulstipo al PFGE.
5011	Santa Fe (Tambo EEA Rafaela INTA)	1-3 %	400.000 cél/ml	Se detectó a los 2 meses post parto y se mantuvo hasta el final de la lactancia en el mismo cuarto mamario.
1570	Roca, Santa Fe	20 %	470.000 cél/ml	Muestras pre y post-tratamiento con antibióticos (enrofloxacin) dieron positivas a <i>S. aureus</i> y el mismo pulstipo al PFGE. Se aisló 3 veces consecutivas del mismo cuarto mamario en un periodo de 6 meses.
5a	San Justo, Santa Fe (tambo N° 2 de Tregar)	4 %	395.000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos.
5b	San Justo, Santa Fe (tambo N° 7 de Tregar)	70 %	591.000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos cada 21 días en un periodo de 6 meses.
20	San Justo, Santa Fe (tambo N° 5 de Tregar)	62 %	525.0000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos cada 21 días en un periodo de 6 meses.
2	San Justo, Santa Fe (tambo N° 2 de Tregar)	4 %	395.000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos cada 21 días en un periodo de 6 meses.
134	San Justo, Santa Fe (tambo N° 10 de Tregar)	32 %	564.000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos cada 21 días en un periodo de 6 meses.
68	San Justo, Santa Fe (tambo N° 7 de Tregar)	70 %	591.000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos cada 21 días en un periodo de 6 meses.
40	San Justo, Santa Fe (tambo N° 11 de Tregar)	7 %	279.000 cél/ml	Detectadas durante la lactancia en tres muestreos consecutivos cada 21 días en un periodo de 6 meses.

Tabla 4: Características generales de las cepas de *S. aureus* seleccionadas para los ensayos in vitro.

	17	358	48	61	247	1595	316	5128	5011
Origen	IIM Clínicas	IIM Clínicas	IIM Clínicas	IIM Clínicas	IIM Clínicas	IIM Subc	IIM Subc.	IIM Subc.	IIM Subc.
Tambo	San Justo, Santa Fe (tambo N° 5 de Tregar)	Buenos Aires	San Justo, Santa Fe (tambo N° 11 de Tregar)	Santa Fe	Córdoba	Roca, Santa Fe	Santa Fe (Tambo EEA Rafaela INTA)	Santa Fe (Tambo EEA Rafaela INTA)	Santa Fe (Tambo EEA Rafaela INTA)
Prevalencia	62%	<10%	7%			18 %	1-3 %	1-3 %	1-3 %
RCS	525.000cél/ml	350.000 cél/ml	279.000cél /ml			450.500 cél/ml	400.000 cél/ml	400.000 cél/ml	400.000 cél/ml
AMS.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisinas	α	α	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta$	β	$\alpha\beta$
Coagulasa	+	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Producción de Biofilm	M	M	F	F	F	M	M	F	F
Dendrograma	A	B	D	F1	F2	E	I	J	K
Resistencia a la penicilina B-lactamasa	+	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>clfA</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>clfB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fnbA</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fnbB</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>icaA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>icaD</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>icaC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>bap</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cna</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>fib</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>cap</i>	Cap8	Cap8	Cap5	Cap5	Cap5	Cap8	Cap8	Cap5	N/T
<i>blaZ</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+
% de internalización en las MAC-T	7,45	1,38	2,55	4,5	1,34	2,28	1,68	2,14	7,48
Tiempo de duplicación en cultivo (segundos)	1943"	2347"	1910"	-	1910"	2764"	2424"	3011"	2528"

Anexo III: Análisis de expresión relativa (R) de genes target en cepas de *S. aureus* invasoras y no invasoras de células del epitelio mamario bovino (MAC-T)

Referencias: I= Internalizada; NI= No internalizada; REF= Gen de Referencia; TRG= Gen target; E= Eficiencia de amplificación; R= Expresión relativa; UP= Expresión significativamente superior respecto a muestra control; DOWN= Expresión significativamente inferior a la muestra control.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(HI)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	2,662	2,418 - 2,946	2,277 - 3,117	0,000	UP
ClfA	NI	TRG	1,0	0,627	0,570 - 0,693	0,541 - 0,728	0,000	DOWN
ClfB	I	TRG	0,9369	3,730	3,271 - 4,254	3,236 - 4,299	0,000	UP
ClfB	NI	TRG	0,9369	1,105	0,794 - 1,539	0,782 - 1,561	0,671	
FnbA	I	TRG	0,9369	42,921	38,638 - 47,876	36,640 - 50,337	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,462	0,402 - 0,532	0,380 - 0,561	0,000	DOWN
FnbB	I	TRG	1,0	37,989	36,663 - 39,389	35,896 - 40,211	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	4,815	2,880 - 8,054	2,820 - 8,222	0,000	UP
IcaA	I	TRG	0,9995	5,374	3,949 - 7,903	3,070 - 9,620	0,000	UP
IcaA	NI	TRG	0,9995	0,976	0,698 - 1,373	0,652 - 1,462	0,664	
IcaD	I	TRG	0,9739	18,059	15,028 - 21,716	14,718 - 22,162	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	0,661	0,582 - 0,751	0,570 - 0,766	0,000	DOWN

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 48.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(HI)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	3,537	2,571 - 5,166	2,067 - 6,157	0,000	UP
ClfA	NI	TRG	1,0	0,081	0,060 - 0,122	0,045 - 0,153	0,000	DOWN
ClfB	I	TRG	0,9369	1,828	1,323 - 2,804	0,983 - 3,505	0,329	
ClfB	NI	TRG	0,9369	0,086	0,062 - 0,130	0,047 - 0,160	0,000	DOWN
FnbA	I	TRG	1,0	2,848	2,272 - 3,573	2,227 - 3,642	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,753	0,729 - 0,778	0,715 - 0,793	0,000	DOWN
FnbB	I	TRG	1,0	406,609	292,947 - 580,770	253,021 - 658,710	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	5,746	3,148 - 10,491	3,112 - 10,608	0,000	UP
IcaA	I	TRG	0,9995	5,903	3,564 - 10,287	2,918 - 12,114	0,000	UP
IcaA	NI	TRG	0,9995	0,350	0,280 - 0,445	0,254 - 0,486	0,000	DOWN
IcaD	I	TRG	0,9739	17,352	11,519 - 26,366	10,656 - 28,325	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	0,235	0,164 - 0,338	0,156 - 0,354	0,172	

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 17.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95 % C.I.	P(H1)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	2,021	1,314 - 3,127	1,230 - 3,326	0,321	
ClfA	NI	TRG	1,0	0,119	0,077 - 0,219	0,051 - 0,289	0,000	DOWN
ClfB	I	TRG	0,9369	0,945	0,579 - 1,549	0,546 - 1,637	0,650	
ClfB	NI	TRG	0,9369	1,772	0,944 - 4,182	0,593 - 5,675	0,495	
FnbA	I	TRG	1,0	97,006	62,692 - 158,832	50,734 - 188,480	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	49,436	33,391 - 85,760	22,920 - 111,722	0,000	UP
FnbB	I	TRG	1,0	23,425	17,081 - 32,331	15,984 - 34,391	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	4,933	2,594 - 10,344	1,948 - 12,848	0,000	UP
IcaA	I	TRG	0,9995	0,829	0,685 - 1,012	0,634 - 1,088	0,676	
IcaD	I	TRG	0,9739	3,296	1,466 - 7,513	1,327 - 8,216	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	5,606	2,983 - 15,955	1,546 - 23,240	0,176	

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 61.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95 % C.I.	P(H1)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	1,075	0,479 - 2,413	0,474 - 2,440	0,662	
ClfA	NI	TRG	1,0	0,583	0,278 - 1,452	0,188 - 1,908	0,336	
ClfB	I	TRG	0,9369	0,818	0,428 - 1,567	0,409 - 1,635	0,838	
ClfB	NI	TRG	0,9369	0,717	0,393 - 1,474	0,285 - 1,865	0,343	
FnbA	I	TRG	1,0	53,446	24,320 - 117,488	23,981 - 119,123	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,444	0,202 - 0,987	0,183 - 1,081	0,328	
FnbB	I	TRG	1,0	29,243	14,608 - 58,767	13,874 - 61,702	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	1,016	0,531 - 2,189	0,386 - 2,770	0,681	
IcaA	I	TRG	0,9995	2,136	0,876 - 5,234	0,827 - 5,524	0,671	
IcaA	NI	TRG	0,9995	0,236	0,117 - 0,964	0,048 - 1,498	0,320	
IcaD	I	TRG	0,9739	6,678	3,321 - 13,655	2,974 - 15,065	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	0,403	0,221 - 0,936	0,137 - 1,277	0,490	

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 247.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(H1)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	57,880	41,338 - 81,052	40,992 - 81,729	0,000	UP
ClfA	NI	TRG	1,0	0,997	0,939 - 1,058	0,931 - 1,066	0,660	
ClfB	I	TRG	0,9369	4,918	3,321 - 7,389	2,998 - 8,100	0,000	UP
ClfB	NI	TRG	0,9369	0,930	0,798 - 1,087	0,764 - 1,133	0,818	
FnbA	I	TRG	1,0	97,006	70,384 - 136,969	61,566 - 153,885	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,963	0,811 - 1,171	0,709 - 1,316	0,673	
FnbB	I	TRG	1,0	23,507	16,585 - 33,753	15,059 - 36,827	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	0,618	0,551 - 0,698	0,512 - 0,746	0,159	
IcaA	I	TRG	0,9995	11,080	6,734 - 19,168	5,522 - 22,547	0,000	UP
IcaA	NI	TRG	0,9995	1,206	0,974 - 1,556	0,817 - 1,802	0,491	
IcaD	I	TRG	0,9739	88,982	56,725 - 139,840	54,763 - 144,659	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	1,523	1,227 - 1,895	1,185 - 1,960	0,000	UP

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 358.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(H1)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	21,706	18,010 - 26,983	15,457 - 30,748	0,000	UP
ClfA	NI	TRG	1,0	0,327	0,276 - 0,399	0,237 - 0,455	0,171	
ClfB	I	TRG	0,9369	1,313	1,258 - 1,372	1,233 - 1,398	0,157	
ClfB	NI	TRG	0,9369	0,646	0,612 - 0,682	0,600 - 0,695	0,150	
FnbA	I	TRG	1,0	56,298	40,258 - 79,639	36,776 - 86,458	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,708	0,506 - 0,993	0,494 - 1,017	0,492	
FnbB	I	TRG	1,0	17,753	14,914 - 21,153	14,540 - 21,682	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	0,342	0,288 - 0,411	0,263 - 0,447	0,000	DOWN
IcaA	I	TRG	0,9995	1,814	1,478 - 2,243	1,371 - 2,405	0,157	
IcaA	NI	TRG	0,9995	0,343	0,314 - 0,376	0,312 - 0,377	0,000	DOWN
IcaD	I	TRG	0,9739	4,236	3,595 - 5,023	3,367 - 5,338	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	0,138	0,118 - 0,165	0,107 - 0,181	0,000	DOWN

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 1595.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(HI)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	1,094	0,939 - 1,299	0,837 - 1,438	0,490	
ClfA	NI	TRG	1,0	0,176	0,113 - 0,286	0,095 - 0,332	0,000	DOWN
ClfB	I	TRG	0,9369	1,166	0,868 - 1,569	0,835 - 1,628	0,827	
ClfB	NI	TRG	0,9369	20,730	15,427 - 27,857	15,324 - 28,044	0,000	UP
FnbA	I	TRG	1,0	5,426	4,039 - 7,329	3,802 - 7,756	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	83,720	62,353 - 112,409	62,266 - 112,566	0,000	UP
FnbB	I	TRG	1,0	1,064	1,006 - 1,129	0,967 - 1,173	0,491	
FnbB	NI	TRG	1,0	6,600	4,014 - 11,230	3,417 - 12,871	0,000	UP
IcaA	I	TRG	0,9995	1,205	0,537 - 2,748	0,483 - 3,021	1,000	
IcaA	NI	TRG	0,9995	3,261	2,613 - 4,070	2,609 - 4,076	0,000	UP
IcaD	I	TRG	0,9739	2,821	2,256 - 3,544	2,124 - 3,751	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	3,810	2,293 - 6,550	1,952 - 7,507	0,000	UP

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 5128.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(HI)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
ClfA	I	TRG	1,0	81,572	78,509 - 84,756	78,290 - 84,992	0,000	UP
ClfA	NI	TRG	1,0	4,976	3,592 - 6,894	3,582 - 6,913	0,170	
ClfB	I	TRG	0,9369	30,890	19,573 - 48,778	19,198 - 49,710	0,000	UP
ClfB	NI	TRG	0,9369	3,934	3,840 - 4,031	3,807 - 4,066	0,000	UP
FnbA	I	TRG	1,0	71,755	43,707 - 131,892	32,035 - 166,069	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,690	0,404 - 1,197	0,364 - 1,316	0,830	
FnbB	I	TRG	1,0	157,586	140,967 - 176,199	139,395 - 178,161	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	3,095	2,478 - 3,867	2,450 - 3,910	0,000	UP
IcaA	I	TRG	0,9995	5,774	4,988 - 6,689	4,876 - 6,838	0,000	UP
IcaA	NI	TRG	0,9995	0,198	0,038 - 1,064	0,034 - 1,170	0,510	
IcaD	I	TRG	0,9739	192,661	171,747 - 216,132	170,844 - 217,267	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	5,293	4,671 - 5,998	4,646 - 6,030	0,000	UP

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 5011.

Gen	Muestra	Tipo	E	R	Error Estándar	95% C.I.	P(H1)	Resultado
GyrB		REF	1,0	1,000				
CifA	I	TRG	1,0	2,454	2,312 - 2,605	2,286 - 2,634	0,000	UP
CifA	NI	TRG	1,0	0,105	0,085 - 0,129	0,084 - 0,130	0,000	DOWN
CifB	I	TRG	0,9369	16,718	13,868 - 20,476	12,458 - 22,535	0,000	UP
CifB	NI	TRG	0,9369	0,073	0,050 - 0,112	0,042 - 0,128	0,000	DOWN
FnbA	I	TRG	1,0	18,700	11,730 - 31,651	9,430 - 37,722	0,000	UP
FnbA	NI	TRG	1,0	0,072	0,053 - 0,102	0,043 - 0,121	0,000	DOWN
FnbB	I	TRG	1,0	11,043	8,992 - 13,570	8,792 - 13,872	0,000	UP
FnbB	NI	TRG	1,0	0,026	0,017 - 0,040	0,017 - 0,041	0,000	DOWN
IcaA	I	TRG	0,9995	13,215	10,873 - 16,084	10,540 - 16,575	0,000	UP
IcaA	NI	TRG	0,9995	1,167	0,961 - 1,418	0,959 - 1,422	0,661	
IcaD	I	TRG	0,9739	28,457	13,380 - 63,498	11,027 - 74,443	0,000	UP
IcaD	NI	TRG	0,9739	1,302	0,603 - 2,812	0,595 - 2,851	0,661	

Valor R y significancia estadística calculado por software REST 2009 V2.0.13. Aislado N° 316.