

Tesis de Posgrado

Aislamiento, caracterización e identificación clonal de mutantes auxótrofos de *Staphylococcus aureus* : aplicación al desarrollo de vacunas

Buzzola, Fernanda Roxana

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Buzzola, Fernanda Roxana. (2001). Aislamiento, caracterización e identificación clonal de mutantes auxótrofos de *Staphylococcus aureus* : aplicación al desarrollo de vacunas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3335_Buzzola.pdf

Cita tipo Chicago:

Buzzola, Fernanda Roxana. "Aislamiento, caracterización e identificación clonal de mutantes auxótrofos de *Staphylococcus aureus* : aplicación al desarrollo de vacunas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3335_Buzzola.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis de Doctorado

**Aislamiento, caracterización e identificación clonal
de mutantes auxótrofos de *Staphylococcus aureus*:
aplicación al desarrollo de vacunas**

Autora: Lic. Fernanda Roxana Buzzola

Director: Dr. Daniel Oscar Sordelli

2001

Nº 3 3 3 5

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología,
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires
Paraguay 2155, piso 12
1121 – Buenos Aires, Argentina

A mis padres

Agradezco al Dr. Daniel Sordelli, Director de este trabajo de Tesis, por brindarme la oportunidad de iniciar mi carrera científica. Por la confianza depositada en mi persona y su constante enseñanza.

A la Dra. Stella Maris González Cappa, ex Directora del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, por permitir la realización de este trabajo en dicho departamento.

A la Dra. Liliana Quelle, por su estímulo y apoyo constante.

A la Dra. Verónica García y a la Dra. Daniela Centrón, por su colaboración desinteresada.

Al Dr. Roberto Caccuri, por su contribución en el área de histopatología.

A todo el personal del Departamento de Microbiología, quienes contribuyeron con el desarrollo de mi trabajo.

A todos los que me brindaron su desinteresada colaboración y afecto.

Los resultados del presente trabajo de Tesis fueron parcialmente publicados en:

Sordelli, D.O., Buzzola, F.R., Gómez, M.I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Catalano, M., Reitz, A.J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P., and Lee, J.C. Capsule expression by bovine isoaltes of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J. Clin. Microbiol.* (2000), 38, p846-850.

Buzzola F.R., Quelle L., Gómez M.I., Catalano M., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Denamiel G., y Sordelli D.O. Genealogical evaluation of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect.* (2001). En prensa.

Buzzola F.R., Quelle L., Steele-Moore L., Berg D. y Sordelli D.O. Molecular diversity of prototypic vaccines and clinical isolates of *Staphylococcus aureus* determined by PFGE typing and ribotyping. *FEMS Microbiol. Lett.* (2001). Enviado para su publicación.

El presente trabajo de Tesis contó con el apoyo económico de las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Fundación "Alberto J. Roemmers"

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Referencias de publicación previa	iii
Aportes económicos	iv
Abreviaturas	vii
Apéndices	viii
1. Introducción	
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> , un patógeno versátil	1
1.2 Mastitis bovina	4
1.3 Inmunoprofilaxis de la mastitis bovina	6
1.4 Tipificación epidemiológica	13
1.5 Hipótesis	17
1.6 Objetivos específicos	18
2. Materiales y Métodos	
2.1 Cepas bacterianas y cultivo	21
2.2 Animales	22
2.3 Extracción de ADN genómico y digestión enzimática	22
2.4 Macrorrestricción genómica y electroforesis en campos pulsados (MECP)	22
2.5 Ribotipificación automatizada	23
2.6 Extracción de ADN plasmídico y digestión enzimática	23
2.7 Marcación de las sondas genómicas	24
2.8 Análisis de similitud, poder discriminatorio y concordancia	24
2.9 Serotipificación del polisacárido capsular	25
2.10 Transferencia, hibridación genómica y detección	25
2.11 Transformación por transducción	25
2.12 Mutagénesis por transposición	25
2.13 Velocidad de crecimiento de los cultivos en medio líquido	26
2.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de modo inverso	27
2.15 Secuenciación nucleotídica	27
2.16 Dosis letal 50 (DL ₅₀)	28

2.17 Modelos de infección sistémica	28
2.18 Permanencia bacteriana en tejido	28
2.19 Estudios histopatológicos	29
2.20 Producción de mieloperoxidasa (MPO)	29
2.21 Protección sistémica	29
2.22 Protección local	30
2.23 Consideraciones estadísticas	30
3. Resultados	
Evaluación genotípica de <i>S. aureus</i> aislados de leche de vacas con mastitis clínica de Argentina por dos métodos de tipificación moleculares	31
Identificación de las cepas de <i>S. aureus</i> 8325-4 y RN6390 entre los aislamientos clínicos	40
Expresión del serotipo capsular de los aislamientos clínicos bovinos de <i>Staphylococcus aureus</i> de Argentina	43
Obtención y aislamiento de mutantes auxótrofas de <i>S. aureus</i> mediante mutagénesis por transposición	49
Caracterización del fenotipo de las mutantes de <i>S. aureus</i> aisladas	55
Caracterización molecular de las mutantes auxótrofas de <i>S. aureus</i> aisladas	62
Determinación del grado de atenuación de la mutante auxótrofa de <i>S. aureus</i>	70
Permanencia en tejido de las cepas de <i>S. aureus</i> usando dos modelos murinos de infección sistémica	78
Evaluación de la capacidad inmunogénica de la mutante atenuada Sa306	85
Identificación de la mutante auxotrofa Sa306 entre aislamientos clínicos de <i>S. aureus</i>	89
4. Discusión	91
5. Conclusiones	102
6. Resumen	105
7. Referencias	108

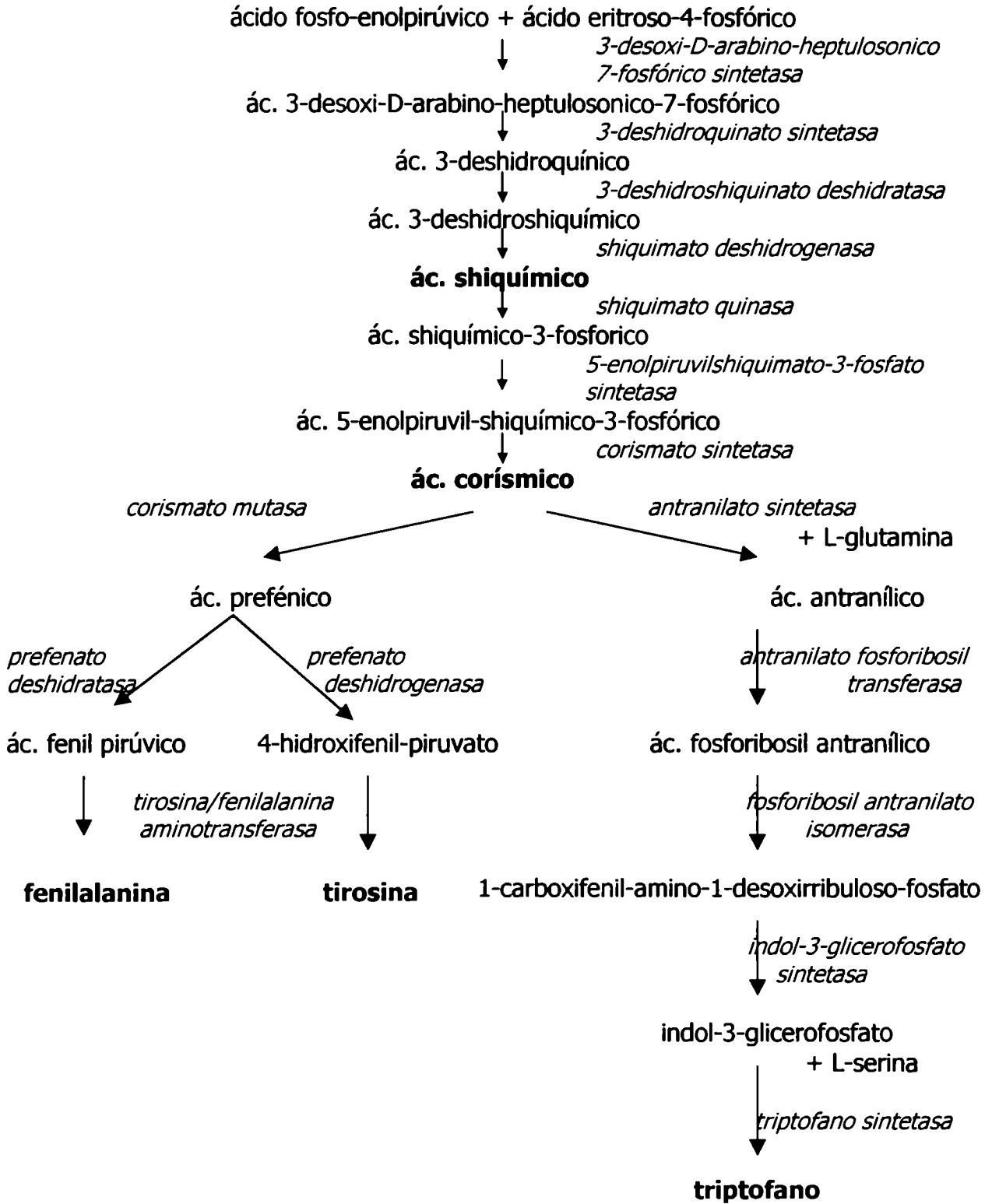
ABREVIATURAS

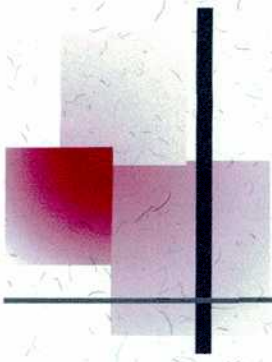
aa: aminoácidos	Phe: fenilalanina
aro: aromático	REAP: restricción enzimática de ADN plasmídico
CC: cerebro-corazón	SF: solución salina fisiológica
Cm: cloramfenicol	Trp: triptofano
Cm ^R : cloramfenicol resistente	Tyr: tirosina
Cm ^S : cloramfenicol sensible	UFC: unidades formadoras de colonias
d: días	
DHB: ácido 2,3 dehidrobenzóico	
DL ₅₀ : dosis letal 50	
DO: densidad óptica	
Em: eritromicina	
Em ^R : eritromicina resistente	
Em ^S : eritromicina sensible	
EPSPS: 5-enolpiruvilshiquimato 3-fosfato sintetasa	
h: horas	
ima: intramamario	
ip: intraperitoneal	
iv: intravenoso	
LPMN: leucocitos polimorfonucleares	
LV: extracto de levadura	
MDM: medio definido mínimo	
MECP: macrorrestricción genómica y electroforesis en campos pulsados (MECP)	
min: minutos	
ml: mililitros	
nt: nucleótidos	
PABA: ácido <i>p</i> -aminobenzóico	
pb: pares de bases	

Apéndice I: Composición del medio mínimo definido (MDM) para el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* (153).

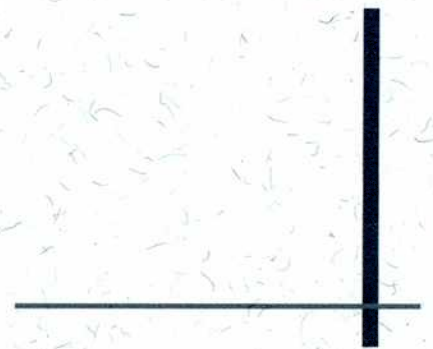
Componente	Concentración solución stock (g/dl)	Concentración en el medio (mM)
Glucosa	50	27,8
K ₂ HPO ₄	3,5	40,2
NaH ₂ PO ₄ . 1H ₂ O	1,0	14,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	7,6
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,064	0,09
Ácido cítrico	0,105	0,20
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	25	2,03
Tiamina	0,1	0,003
Ácido nicotínico	0,12	0,01
Pantotenato de calcio	0,025	0,001
Biotina	0,0005	0,00002
L- alanina	0,06	0,67
L- arginina	0,05	0,24
L- ácido aspártico	0,09	0,68
L- cisteína	0,02	0,083
L- ácido glutámico	0,10	0,61
L- glicina	0,05	0,67
L- histidina	0,02	0,095
L- isoleucina	0,03	0,23
L- leucina	0,09	0,68
L- lisina	0,05	0,27
L- metionina	0,01	0,07
L- fenilalanina	0,04	0,24
L- prolina	0,01	0,09
L- serina	0,03	0,29
L- treonina	0,03	0,25
L- triptofano	0,01	0,05
L- tirosina	0,05	0,28
L- valina	0,08	0,68
Piridoxal. HCl	0,4	0,020
Piridoxamina. 2HCl	0,4	0,017
Riboflavina	0,1	0,005
Aderina	0,1	0,037
Uracilo	0,1	0,045
Citosina	0,1	0,045
Guanina	0,1	0,033
Timina	0,1	0,160

Apéndice II: Esquema de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en *Staphylococcus aureus*. (20)





Introducción



1.1 *Staphylococcus aureus*, un patógeno versátil

1.1.1 Biología

Staphylococcus aureus es un miembro de la familia *Micrococcaceae*. Cuando se examina al microscopio, esta bacteria aparece como coco Gram positivo. La división celular en más de un plano produce agrupaciones en racimo, típicas de éste género. Esta bacteria presenta una pared celular de peptidoglicano caracterizada por múltiples residuos de glicina que la hacen sensible a la lisostafina (96). *S. aureus* es anaerobio facultativo y posee requerimientos nutricionales relativamente complejos, necesitando 5-12 aminoácidos esenciales y 2-3 vitaminas del grupo B. Esta bacteria es catalasa-positivo, coagulasa-positivo, tolerante a altas concentraciones de ClNa y fermenta el manitol (144). *S. aureus* es un patógeno capaz de adaptarse al menos a tres tipos de ambientes distintos. Esta bacteria puede vivir libremente fuera del huésped, puede existir como colonizador externo o comensal y puede vivir dentro del tejido del huésped causando enfermedad (96).

1.1.2 Epidemiología

Los estafilococos han sido y continúan siendo una importante causa de infección bacteriana en humanos. En Estados Unidos, *S. aureus* es una de las bacterias patógenas de mayor incidencia en las infecciones adquiridas en el ambiente hospitalario (144). *S. aureus* es un patógeno extremadamente versátil que causa un amplio espectro de enfermedades, las cuales pueden ser agrupadas en cuatro tipos generales: i) infecciones de piel o mucosas, como un absceso cutáneo o una infección de una herida; ii) infecciones profundas y/o sistémicas, como osteomielitis, endocarditis, neumonía y septicemia; iii) enfermedades con infección e intoxicación, como el síndrome del shock tóxico; e iv) intoxicación alimentaria causada por la ingestión de enterotoxinas estafilocócicas (96). Por otro lado, *S. aureus* coloniza las narinas, el recto y la piel. En general, la colonización por *S. aureus* evoluciona hacia infecciones clínicas aparentes sólo después de la ruptura de las barreras de piel o mucosas. Como ejemplo digno de mención dentro del campo veterinario, las pequeñas lesiones de la

ubre ocasionadas por el continuo ordeño de las vacas actúan de puerta de entrada para *S. aureus* que ocasiona una infección manifiesta en la glándula mamaria bovina (38). Debe considerarse que los estafilococos que causan enfermedad en humanos y animales no son organismos inherentemente patogénicos. Por cada enfermedad causada por un *Staphylococcus*, existen varios individuos que están benignamente colonizados por estafilococos sin presentar signos de enfermedad.

1.1.3 Patogénesis de la infección por *S. aureus*

La infección por *S. aureus* se inicia con la entrada y establecimiento de la bacteria que se encuentra en fase latente del crecimiento. Luego, comienza la multiplicación bacteriana que está acompañada por la síntesis de proteínas de superficie que promueven la adhesión y favorecen la colonización del sitio anatómico. El aumento del número de bacterias durante la fase exponencial activa un mecanismo sensor de la densidad bacteriana que estimula la producción de exoproteínas y/o toxinas que, durante la fase estacionaria, facilitan la fuga de las bacterias del sitio de infección local (absceso) para producirse la diseminación bacteriana a nuevos sitios del huésped, donde se repetiría el ciclo (165).

S. aureus puede colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de nichos ambientales. Para ello, esta bacteria despliega un repertorio de factores de virulencia que incluyen proteínas asociadas a la superficie de la célula bacteriana, así como también exoproteínas. Al respecto, entre los factores involucrados en la adhesión de *S. aureus* a la célula o a la matriz extracelular se encuentran la proteína de unión al fibrinógeno, la proteína de unión a la fibronectina, la proteína de unión al colágeno, la coagulasa, adhesinas y el factor de agrupamiento ("clumping factor"). Por otro lado, las distintas enterotoxinas (A, B, C1-3, D, E, H), la toxina 1 del shock tóxico (TSST-1), las toxinas exfoliativas A y B, la proteína A, la lipasa, la proteasa V8, las leucocidinas, la estafiloquinasa, los serotipos capsulares 1, 2, 5 y 8 se hallan implicados en la evasión de los mecanismos de defensa del huésped. Entre los factores de virulencia involucrados en la invasión y penetración tisular se encuentran las hemolisinas (α , β , γ y δ), la fosfolipasa C, la elastasa y la hialuronidasa (165).

La capacidad de *S. aureus* para causar una multitud de infecciones es consecuencia de la expresión coordinada de todos estos determinantes de virulencia y está controlada principalmente, por los locus regulatorios globales denominados *agr* ("accessory gene regulator") y *sar* ("staphylococcal accessory regulator") (5, 17, 35, 52, 99, 168). Los estafilococos alcanzan esta coordinación mediante la autoinducción (88). El locus regulatorio *agr* codifica un sistema sensor de la densidad bacteriana o "quorum sensing" que está involucrado en la regulación positiva de la producción de proteínas extracelulares y de la regulación negativa de la síntesis de proteínas asociadas a la pared celular durante la fase exponencial tardía del crecimiento bacteriano (86, 145). En contraste a *agr*, el locus *sar* activa la síntesis de proteínas extracelulares (Ej. α - y β -hemolisinas) y de pared celular (Ej. proteína de unión a la fibronectina) en *S. aureus* (35).

Tradicionalmente, *S. aureus* ha sido considerado un patógeno extracelular. Sin embargo, hay evidencia creciente que *S. aureus* puede persistir por dentro de células epiteliales, endoteliales, osteoblastos y leucocitos polimorfonucleares (19, 64, 87). Estas observaciones sugieren que la supervivencia intracelular de *S. aureus* podría contribuir en infecciones como osteomielitis, endocarditis y mastitis bovina. Interesantemente, en un estudio reciente fue observado que el 70% de los aislamientos provenientes de leches mastíticas fueron capaces de invadir células epiteliales bovinas en cultivo (75). Los mecanismos por los cuales *S. aureus* persiste en ciertos tejidos del huésped aún se desconocen y merecen una investigación exhaustiva.

A fin de explotar eficientemente los nichos dentro del huésped, *S. aureus* debe coordinar sus procesos metabólicos para adaptarse a un ambiente cambiante. Esto está sustentado por los resultados de experimentos sofisticados, como la tecnología de expresión *in vivo* (IVET) y la "signature-tagged mutagenesis" (STM), los cuales se utilizaron para identificar determinantes expresados *in vivo* asociados con la patogenicidad (39, 74, 123). Los componentes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y en el metabolismo energético, al igual que las proteínas transportadoras, han sido identificadas como fundamentales para la supervivencia de *S. aureus in vivo* (37). Sin embargo, la contribución de las alteraciones en el metabolismo bacteriano a la patogénesis no ha sido bien definida. Ciertamente, el reciente avance en el

conocimiento respecto a los diferentes determinantes de virulencia de *S. aureus* posibilita ahondar en el estudio de la patogénesis de las infecciones estafilocócicas.

1.2 Mastitis bovina

1.2.1 Definición

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria y es aún la más importante enfermedad de los rebaños lecheros por las pérdidas que ocasiona (13). Puede ser causada por infección, lesiones traumáticas, alteraciones secretorias de base metabólico-nutricional o por situaciones de estrés o cambios fisiológicos asociados a la terminación temprana de la lactancia (179). La inflamación de la glándula mamaria influencia directamente la salud y el bienestar de los animales, al igual que la calidad y cantidad de la leche producida. Si bien existen causas no infecciosas que pueden desencadenar los mecanismos que caracterizan a la reacción inflamatoria, se estableció que el 70-80% de los casos corresponden a mastitis de causa infecciosa (83). Existen dos manifestaciones de la mastitis: en su forma *clínica* los cuartos mamarios muestran signos clínicos inflamatorios evidentes; sin embargo la mastitis *subclínica* es sólo detectable a través de análisis de laboratorio de la leche (recuento de células somáticas, cambios en la composición, alteraciones conductimétricas, aislamientos de microorganismos, etc) (58). Si bien varias especies bacterianas pueden causar mastitis, tanto en nuestro país como en la mayoría de los países del mundo, cerca del 80% de las infecciones mamarias ocurren por *S. aureus* (38, 131, 176, 231). El resto de las mastitis infecciosas se deben a otros cocos Gram-positivos, bacterias coliformes y otros patógenos menores. Por otro lado, la importancia de la mastitis en la salud pública radica principalmente en la pérdida del valor biológico de las leches mastíticas y en la posibilidad de acarrear microorganismos patógenos (Ej. intoxicaciones por enterotoxinas de *S. aureus* que no se inactivan por la pasteurización). Asimismo, la leche puede vehiculizar residuos de productos antibióticos o quimioterápicos utilizados en el tratamiento de las enfermedades de la ubre (225).

1.2.2 Infección de la glándula mamaria

En general, las bacterias penetran a la glándula mamaria a través del canal del pezón, que es la primera y quizás más importante barrera de defensa. Existen varios mecanismos de defensa de la glándula mamaria, como la acción mecánica de cerrado del esfínter, la capa de queratina (con proteínas y ácidos grasos con propiedades bactericidas) que reviste el canal del pezón y la capacidad del tejido epitelial local de producir factores inmunológicos específicos (157). Por otro lado, las bacterias patógenas pueden ascender por multiplicación a través del canal por propulsión directa (movimientos de las bacterias, capilaridad), indirecta (impactos por la máquina de ordeñar) o por ambos procesos simultáneamente (38).

Durante el curso de la mastitis, se produce la infiltración de células somáticas en la glándula mamaria como resultado de la liberación de citoquinas quimiotácticas. El término "células somáticas" se refiere a los leucocitos, específicamente linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares (PMN), junto a un pequeño porcentaje de células epiteliales que están presentes en la leche (158). Numerosos estudios han mostrado que el conteo de células somáticas (CCS) de las secreciones mamarias está directamente correlacionado con el estado de la infección (45, 95). Usualmente, el CCS en leche de un bovino sano es menor a 200.000/ml. Sin embargo, durante la inflamación de la glándula mamaria, el CCS aumenta a millones/ml (69). Esta población local de células somáticas sirve como un importante mecanismo de defensa de la glándula mamaria contra la infección (117).

1.2.3 Inmunidad de la glándula mamaria

La interacción entre el sistema inmune del huésped y el patógeno invasor es fundamental en la determinación del resultado de una infección (100). La glándula mamaria está protegida por diversos mecanismos de defensa, los cuales pueden ser separados en dos categorías distintas: inmunidad innata e inmunidad específica (196). La inmunidad innata, también conocida como respuesta no específica, es el mecanismo de defensa predominante durante los estados tempranos de la infección.

La respuesta inmune no específica está presente o es activada rápidamente en el sitio de infección por numerosos estímulos; sin embargo no es exacerbada como consecuencia de la exposición repetida al mismo patógeno. La respuesta innata o no específica de la glándula mamaria está mediada por: las barreras físicas del pezón, los macrófagos, los neutrófilos, células tipo NK ("natural killer") y por ciertos factores solubles (lactoferrina, complemento, lisozima y el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrogeno) (31, 63, 148, 157, 170, 190, 194, 195).

Contrariamente, la respuesta inmune específica o adquirida reconoce determinantes antigénicos particulares de un patógeno y facilita la eliminación selectiva. El reconocimiento de factores patogénicos está mediado por las moléculas de anticuerpos, macrófagos y varias poblaciones linfoides (18, 202). Como parte de la respuesta contra el patógeno por parte del huésped, un importante número de leucocitos migran a la ubre durante la infección estafilocócica de la glándula mamaria bovina. Recientemente, se determinó en secreciones mamarias de bovinos con mastitis la presencia aumentada de células $T_{\alpha-\beta}$, debido al incremento del número de células T_{CD4+} , así como el incremento del número de células $T_{\gamma-\delta}$ (192). Por lo tanto, como consecuencia de la memoria de ciertos linfocitos, la respuesta inmune específica puede ser exacerbada por la repetida exposición a un patógeno o por una vacuna.

1.3 Inmunoprolifaxis de la mastitis bovina

1.3.1 Vacunas contra la mastitis

La vacunación del huésped susceptible es una de las formas más efectivas para lograr la prevención de la enfermedad (109). Las vacunas contra las mastitis deberían eliminar la infección intramamaria, impedir el establecimiento de nuevas infecciones de la glándula mamaria y reducir la frecuencia y severidad de la enfermedad clínica. Se han realizado numerosos intentos para lograr una vacuna que impida la mastitis por *S. aureus* en los bovinos, pero hasta el momento los resultados no han sido del todo efectivos. Los estudios iniciales utilizaron bacterinas derivadas de cultivos de

crecimiento *in vitro* e inyectadas por vía sistémica. A pesar de haberse observado un aumento en el título de anticuerpos séricos, no se logró prevenir una nueva infección intramamaria (6, 26). Como consecuencia de una mayor información disponible acerca de los importantes mecanismos patogénicos de *S. aureus* (201), se desarrollaron nuevas y diferentes formulaciones antigénicas para ser utilizadas como vacunas. En este sentido, una preparación basada en la proteína A de *S. aureus* aumentó la tasa de curación espontánea aunque no tuvo efecto sobre la tasa de nuevas infecciones (151). Otros autores propusieron una vacuna basada en la proteína de unión a la fibronectina, pero no se obtuvieron los resultados deseados (135, 137). Otros estudios han demostrado que los rebaños vacunados con toxoides de α - y β -hemolisinas junto con polisacárido extracelular presentaban una disminución de la tasa de nuevas infecciones intramamarias y éstas fueron de duración más corta respecto del grupo no vacunado (185). Sin embargo, a la fecha, la eficacia de esta formulación no fue evaluada en pruebas de campo con ganado vacuno.

Un grupo de investigadores de la Universidad Nacional de Río Cuarto desarrollaron una vacuna contra la mastitis estafilocócica y estreptocócica compuesta por un extracto de exopolisacáridos de *S. aureus* junto con cepas capsuladas inactivadas (serotipo 2 y serotipo A) de *S. aureus* y por cepas muertas de *Streptococcus uberis* y *S. agalactiae* (30, 60). Los resultados de las pruebas de campo indicaron que la vacunación con dicha preparación no disminuyó la frecuencia de mastitis estreptocócica siendo la incidencia de la mastitis clínica por *S. aureus* levemente reducida. Además, no existen reportes que describan la composición química del tipo A de polisacárido capsular que forma parte de esta vacuna. Por otro lado, otros autores desarrollaron una vacuna compuesta por bacterias de *S. aureus* cultivadas bajo condiciones simil-*in vivo* a fin de promover la expresión de antígenos capsulares (217). La inmunización de vacas con esta vacuna indujo una cierta protección frente al desafío experimental con *S. aureus*, lo que sugiere la importancia de considerar a los factores de virulencia expresados sólo *in vivo* para la formulación de una vacuna eficaz (218). Lamentablemente, el material capsular que compone la vacuna de Watson *et al* (218) no ha sido purificado y también se desconoce la composición química del mismo.

Hasta el presente, las vacunas ensayadas en bovinos que mostraron resultados favorables establecieron que la inmunización redujo fundamentalmente la severidad de la mastitis clínica e incrementó discretamente la cura espontánea. Sólo la vacuna formulada por Watson *et al* (218) pareció disminuir discretamente la incidencia de nuevos casos de mastitis. Las razones por las que aún no se cuenta con una vacuna eficaz contra la mastitis bovina estafilocócica podría deberse a la disparidad de antígenos utilizados, a la falta de identificación de factores de virulencia y/o al cronograma de administración de la vacuna respecto al ciclo de lactancia (53).

1.3.2 Polisacárido capsular y su rol en la preparación de vacunas

En general, las bacterias capsuladas son resistentes a la fagocitosis por los leucocitos. Debido a que los anticuerpos dirigidos hacia la cápsula neutralizan las propiedades antifagocíticas del polisacárido capsular, este antígeno se ha convertido en el blanco de estudio para la formulación de numerosas vacunas (173).

Aunque la mayoría de los *S. aureus* producen polisacárido capsular, en general presentan una microcápsula o pseudocápsula que es más pequeña que la cápsula expresada por los aislamientos altamente capsulados. De los 11 serotipos capsulares descritos, sólo los serotipos 1 y 2 son eminentemente capsulados y el resto son microcapsulados (93). La mayoría de los aislamientos clínicos de humanos producen el serotipo 5 (PC5) o serotipo 8 (PC8) del polisacárido capsular (177, 193), mientras que se ha reportado una prevalencia variable en el serotipo capsular de aislamientos de origen animal de diferentes áreas geográficas del mundo (65, 133, 162). En Estados Unidos al igual que en Francia, el 70% de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* presentan PC5 o PC8 (133, 163). Es por ello, que comenzó a tener relevancia la utilización de alguno de estos serotipos (PC5 u PC8) en la preparación de vacunas que prevengan la mastitis bovina.

La mayoría de los polisacáridos capsulares bacterianos son pobres inmunógenos en animales y humanos (136). Sin embargo, si el polisacárido purificado es conjugado a una proteína o molécula transportadora, adquirirá inmunogenicidad. La inmunización

con serotipos 5 y 8 de polisacárido capsular unido covalentemente al exotoxide A de *Pseudomonas aeruginosa*, protegió a los ratones de la letalidad inducida por la infección sistémica con *S. aureus* (47). Sin embargo, esta vacuna no fue probada experimentalmente en vacas lecheras por lo que se desconoce la eficacia de esta preparación en la prevención de la mastitis bovina. Por otro lado, Yoshida *et al* (227) formularon una vacuna compuesta por cepas de *S. aureus* capsuladas junto con antígenos capsulares parcialmente purificados. Para ello utilizaron cepas de *S. aureus* que poseían los serotipos capsulares más frecuentes hallados en esa región. Los estudios de campo mostraron una disminución de las pérdidas en la producción de leche, así como una reducción en los valores de recuentos celulares. Ciertamente, el trabajo de Yoshida *et al* puso de manifiesto la importancia de realizar un estudio epidemiológico de la región previamente a la preparación de una vacuna.

En conjunto, estas observaciones indican que se requieren más estudios para establecer si el polisacárido capsular debería ser un componente fundamental de una vacuna contra la mastitis de los bovinos.

1.3.3 Cepas vivas atenuadas como vacunas

La vacuna ideal para la profilaxis de las infecciones mamarias por *S. aureus* debería inducir la respuesta humoral mediante anticuerpos que impidan la adherencia, que promuevan la muerte bacteriana por fagocitosis mediada por opsoninas y que neutralicen las exoproteínas tóxicas producidas por la bacteria. Asimismo, debería inducir la respuesta inmune celular antibacteriana, citotóxica y supresora; y fundamentalmente generar memoria inmunológica (225).

Numerosos estudios han mostrado resultados efectivos respecto a la utilización de cepas vivas atenuadas como vacunas (51, 90, 113, 164). Ciertamente, las vacunas vivas proveen antígenos con mayor capacidad protectora tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, dado que los procedimientos químicos y físicos utilizados para la preparación de vacunas a células muertas pueden alterar a los inmunógenos. Por otro lado, la inmunidad de larga duración sería inducida por vacunas compuestas por

cepas vivas atenuadas, ya que el organismo se multiplicaría en el huésped y de esta manera produciría una estimulación continua del sistema inmune (125). De esta manera se lograría una óptima protección frente a las infecciones bacterianas, mimetizando así la inmunidad generada por la propia infección. La explicación para este fenómeno radicaría en que la bacteria viva induce tanto inmunidad mediada por células como inmunidad humoral (125).

Uno de los problemas asociados con las vacunas compuestas por cepas vivas es la posibilidad de reversión al fenotipo virulento. El caso más simple de reversión de una vacuna viva puede ocurrir por sustitución espontánea de una base dentro del gen que lleva la mutación o en un segundo sitio suprimiendo, por lo tanto, la mutación atenuante. Claramente, la mejor manera de evitar la reversión de vacunas vivas es introducir mutaciones por delección para lograr la atenuación (124). En los últimos años se han reportado diversos procedimientos para lograr cepas con fenotipos avirulentos a partir de bacterias de reconocida patogenicidad (89, 127, 128). Uno de estos procedimientos es la mutagénesis por inserción en el cromosoma de un elemento transponible (42). Numerosos trabajos han utilizado exitosamente transposones para obtener mutantes con inserciones en genes que contribuyen a la virulencia de *S. aureus* (35, 36, 106). En todos los casos el transposón fue introducido a la bacteria receptora mediante transformación, conjugación o transducción. La utilización de plásmidos letales condicionales es una de las estrategias más utilizadas para introducir un transposón en *S. aureus* (29). Mediante esta metodología se han obtenido diversas mutantes bacterianas con fenotipo termosensible (crecimiento limitado a la temperatura corporal de los mamíferos) (25) o con diferentes fenotipos auxotróficos (8, 85, 146, 188) que fueron atenuadas en su patogenicidad en modelos animales de infección.

1.3.4 Atenuación bacteriana por auxotrofías

La atenuación de patógenos bacterianos mediante mutaciones auxotróficas fue primero demostrada por Bacon *et al* (15) con "*Bacterium typhosa*". Tres décadas después, Hoiseth y Stocker (77) mostraron que una mutante *aroA* (5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintetasa) de *Salmonella typhimurium* fue atenuada y una

excelente vacuna viva en un modelo murino de tifoidea. Esta enzima es parte de la vía metabólica de los aminoácidos aromáticos (*aro*), la cual lleva, a través del ácido shikímico al ácido corísmico. El corismato es un punto de ramificación en el cual se separan diferentes vías biosintéticas. Las que dan origen a: i) los aminoácidos aromáticos; ii) al ácido *p*-aminobenzóico (PABA) y por consiguiente el ácido fólico; iii) a la vitamina K; iv) a la ubiquinona y por lo tanto al sistema de transporte de electrones; y v) al ácido dehidrobenzóico (DHB), el cual es el primer paso en la biosíntesis del sideróforo enterocolina (111, 160). La vía del shikimato ocurre en procariontes, levaduras y hongos filamentosos, en ciertos parásitos (94) y en los plástidos de plantas y algas. Sin embargo, la vía metabólica *aro* no está presente en los vertebrados, significando que éstos deben obtener los productos esenciales derivados del ácido corísmico de su dieta y que los intermediarios de esta vía no están disponibles para complementar los requerimientos de un auxótrofo. Asimismo, mutaciones en *aroC*, *aroD* y *aroB* fueron igualmente atenuantes, confirmando el rol clave de la vía *aro* para la virulencia de ciertas bacterias (44, 67) (Apéndice II).

Hasta el presente, se han atenuado diversas bacterias patógenas por introducción de mutaciones estables en diferentes rutas biosintéticas. Las auxotrofías generadas por lesiones en genes *aro* (76, 150, 175, 188, 214), *leu* (85, 120), *pur* (146, 187), *thy* (8), *rib* (55), que afectan la biosíntesis de aminoácidos, purinas, timina y riboflavina, respectivamente son atenuantes debido a que éstas eliminan la capacidad de la bacteria para sintetizar un componente crítico que no está fácilmente disponible en el tejido de los mamíferos. Por ejemplo, la virulencia reducida de las mutantes *rib* se debe a su requerimiento de riboflavina o vitamina B2 que es esencial para el metabolismo pero no es sintetizada por los animales superiores. Por lo tanto, la escasa disponibilidad de este compuesto limita el crecimiento de las mutantes *rib* en el huésped (55).

Mediante novedosas estrategias que posibilitan identificar genes que se expresan sólo *in vivo* se han identificado un cierto número de genes de *S. aureus* requeridos para el crecimiento, persistencia y virulencia en diversos tejidos infectados. Algunos de estos genes están involucrados en la biosíntesis de purinas y pirimidinas, de cofactores

y de aminoácidos (74, 123).

Interesantemente, la mayoría de las mutantes auxótrofas estudiadas han demostrado ser capaces de estimular inmunidad protectora en diferentes modelos animales (9, 23, 77, 213). Es factible que las razones por las cuales las mutantes auxótrofas han mostrado ser inmunogénicas, se deban a que los antígenos de superficie permanecen intactos y son presentados en su conformación nativa y a que la replicación limitada de la bacteria posibilita la producción de exotoxinas contra las cuales el huésped puede producir anticuerpos. También, el crecimiento limitado permite la expresión de genes que codifican para antígenos que son sintetizados sólo *in vivo* y posibilita un estímulo prolongado de los mecanismos de defensa del huésped.

Los reportes de los últimos años demuestran la factibilidad de obtener mutantes avirulentas e inmunogénicas de varias bacterias patógenas. Por lo tanto, se sugiere que mediante una lesión en algún gen de una vía metabólica (Ej. *aro*) sería posible obtener una mutante auxótrofa de *S. aureus* que sea atenuada y que pueda ser utilizada como vacuna viva.

1.3.5 Análisis estructural genético de la población bacteriana

Estudios sobre la diversidad y estructura genética de las poblaciones naturales de numerosos patógenos humanos y animales han revelado que: i) la mayoría de las especies son naturalmente clonales; ii) el número de clones es relativamente pequeño; y iii) la mayoría de los casos de enfermedades serias son causados por un pequeño porcentaje del total de clones existentes (221). Estudios previos con poblaciones naturales de *S. aureus* han identificado una considerable heterogeneidad genética (130, 186). Varios autores han sugerido que sólo un pequeño número de clones de *S. aureus* aislados de leche de bovinos fueron responsables de la mayoría de los casos de mastitis y que estas cepas tuvieron una distribución geográfica amplia (49, 50, 91). Una estrategia racional para el control de las infecciones intramamarias debería considerar los clones que comúnmente causan enfermedad. Por lo cual, debería ser relevante determinar la estructura genética de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus*

procedentes de diferentes áreas geográficas.

La identificación de los clones prevalentes de *S. aureus* aislados de secreciones mamarias de vacas con mastitis proveería una base metódica para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la mastitis bovina. En vista de que sería factible contar con una mutante de *S. aureus* auxótrofa y atenuada, debería considerarse que la misma induzca inmunidad protectora en la población de individuos vacunados. En otras palabras, la cepa vacuna debería proteger al ganado bovino local de la infección intramamaria producida por los clones de *S. aureus* responsables de la mayoría de los casos de mastitis de Argentina. Lamentablemente, en nuestro país no existen reportes de datos epidemiológicos moleculares referentes a los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus*. A fin de establecer las características antigénicas de una futura vacuna para combatir la mastitis presente en las cuencas lecheras del país, sería necesario estudiar la diversidad genética de la población local de aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* por medio de técnicas moleculares de tipificación.

1.4 Tipificación epidemiológica

1.4.1 Aspectos generales

La tipificación epidemiológica bacteriana puede ser llevada a cabo mediante técnicas fenotípicas y/o genotípicas. Las primeras se basan en la detección de características expresadas, como la resistencia a antibióticos (susceptibilidad antimicrobiana), la presencia de un determinado tipo capsular (serotipificación), la susceptibilidad a la infección con diferentes fagos (fagotipificación), la fermentación de diferentes compuestos, el crecimiento en diversas condiciones de cultivo (biotipificación), etc. (11). Sin embargo, la mayoría de los métodos fenotípicos han caído en desuso debido a la pobre discriminación y baja reproducibilidad de algunas de estas técnicas. Por otro lado, durante la última década ha tomado auge la utilización de métodos moleculares de tipificación debido a que presentan una sensibilidad mayor y una reproducibilidad muy satisfactoria (12). Las técnicas moleculares se basan en el

análisis de ADN cromosomal o de elementos genéticos extracromosomales. Mediante estos métodos se detectan las diferencias genómicas que, por ejemplo, influyen en la distancia entre los sitios de restricción y por lo tanto en el patrón de corte de una endonucleasa particular y entonces su movilidad en una electroforesis (223).

La tipificación de cepas bacterianas ha demostrado ser una herramienta útil de investigación y ha contribuido al desarrollo de novedosas maneras de incursionar en el campo de la epidemiología y de la patogénesis de la infección bacteriana (205).

Con frecuencia, los aislamientos de una misma especie tomados al azar difieren en múltiples características, mientras que la progenie de un aislamiento en particular es prácticamente indistinguible o altamente similar. En esencia, la tipificación molecular explota la diversidad genética dentro de una especie bacteriana e identifica cepas particularmente relevantes. La diversidad genética refleja la acumulación de mutaciones al azar y no letales resultantes de un amplio rango de mecanismos. Las técnicas moleculares actuales pueden revelar alteraciones sutiles y literalmente detectar un único evento genético dentro del cromosoma bacteriano (46, 62). Diversas técnicas moleculares se han aplicado en microbiología veterinaria para la caracterización de cepas de *S. aureus* de origen bovino (3, 40, 167, 199, 230).

Estudios epidemiológicos realizados con aislamientos de *S. aureus* de origen bovino han mostrado que un gran número de genotipos están involucrados en la etiología mundial de la mastitis del ganado vacuno y que ciertos genotipos parecen predominar dentro de determinadas regiones geográficas (4, 132, 172, 230). Ciertamente, es menester estudiar el/los genotipo/s responsable/s de la mayoría de los casos de mastitis bovina de nuestro país.

1.4.2 Epidemiología molecular

Los métodos moleculares más ampliamente utilizados en estos últimos años para discriminar aislamientos clínicos de *S. aureus* se basan en las variaciones genómicas que establecerán diferentes: i) polimorfismos en los tamaños de los fragmentos de

restricción (macrorestricción con *Sma*I y electroforesis en campos pulsados, ribotipificación, hibridación con sondas de *mecA* y Tn554 de digestos genómicos); ii) polimorfismos detectados por PCR (regiones repetitivas del gen de la coagulasa y de la proteína A, etc); y iii) polimorfismos de ADN plasmídico (223).

1.4.2.1 Macrorestricción genómica y separación de los fragmentos por electroforesis en campos pulsados (MECP)

El análisis cromosomal por electroforesis en campos pulsados ha demostrado ser una herramienta epidemiológica especialmente poderosa que permite el monitoreo del cromosoma en un sentido global. Este método posibilita detectar cambios en el tamaño de los fragmentos de restricción como consecuencia de eventos genéticos que han afectado las distancias intracromosómicas entre las secuencias correspondientes a sitios de restricción raros (61). Hay que tener en cuenta el requerimiento de moléculas de ADN intactas para generar perfiles de fragmentos de macrorestricción utilizando enzimas de baja frecuencia de corte. Para tal fin, el ADN cromosómico se embebe en bloques pequeños de agarosa. Para la interpretación de los resultados, es conveniente utilizar un criterio objetivo y apropiado, como el propuesto por Tenover *et al* (204). De esta manera, la MECP se convierte en una herramienta altamente efectiva para determinar la relación epidemiológica entre aislamientos clínicos bacterianos de origen humano y animal (62).

1.4.2.2 Ribotipificación

La ribotipificación se refiere a la caracterización de una cepa sobre la base del polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción genómicos asociado con los operones ribosomales (ARN ribosomal 16S y 23S y de transferencia) (198). Las secuencias ribosomales son altamente conservadas y sondas preparadas de ARNr de *E. coli* hibridan a los operones ribosomales de otras especies bacterianas, incluyendo a *S. aureus*. Todos los estafilococos poseen múltiples operones ribosomales (5 a 7) y son, por lo tanto, tipificables (11).

Recientemente, el desarrollo de la tecnología permitió la adquisición automatizada y normatización de los datos basados en la ribotipificación (27, 81, 219, 222). La ribotipificación automatizada permite comparar perfiles generados en distintos tiempos y lugares. Junto al análisis estadístico, los datos de ribotipificación automatizada permite la identificación bacteriana a los niveles de especie, subespecie y cepa.

1.4.2.3 Perfiles de restricción de ADN plasmídico (REAP)

El análisis de los patrones de ADN plasmídico es técnicamente simple. Sin embargo, la reproducibilidad de los perfiles puede ser difícil de lograr debido a la existencia del plásmido en diferentes formas moleculares. Este problema puede ser evitado por tratamiento del ADN plasmídico con una endonucleasa de restricción (232). El análisis del número y tamaño de los fragmentos de digestión resultantes es referido como REAP (11). Existen varios estudios en los cuales los aislamientos se caracterizaron por genotipos cromosomales y plasmídicos, mediante la MECP y REAP, respectivamente (24, 70, 203). En general, los estudios con plásmidos fueron muy efectivos cuando se evaluaron aislamientos obtenidos dentro de un corto período o cuando provienen de un sitio específico restringido (14).

1.4.2.4 Otros métodos

Por medio de diferencias en la movilidad electroforética de las enzimas solubles de importantes vías metabólicas ("multilocus enzyme electrophoresis") bacterianas se reflejan indirectamente polimorfismos genotípicos. Las diferencias en la movilidad electroforética son debidas a mutaciones que afectan la carga de una enzima. Este método es bastante laborioso y por ello no muy utilizado en estudios epidemiológicos de *S. aureus*. Por otro lado, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pueden detectar en corto tiempo diferentes tamaños de amplicómeros o tamaños polimórficos en secuencias repetitivas de ADN (223). La utilización de cebadores con una secuencia arbitraria provoca el polimorfismo del ADN bacteriano amplificado al azar por medio de la PCR (RAPD-PCR) (215). Asimismo, la

utilización de cebadores homólogos con secuencias repetitivas intragénicas permite establecer polimorfismos genómicos bacterianos. Para *S. aureus*, se utilizan las secuencias repetitivas de los genes de la coagulasa (*coa*) y de la proteína A (*spa*) (54, 184). Recientemente, se ha propuesto el análisis de la secuencia nucleotídica de un locus determinado (Ej. gen de resistencia a quinolonas) como otra técnica de tipificación molecular (223)

1.5 Hipótesis de trabajo

Debido a que las infecciones estafilocócicas involucran múltiples determinantes de virulencia, nuevas estrategias son necesarias para combatir las infecciones causadas por *S. aureus*. Al respecto, nuestro equipo de trabajo propone utilizar cepas vivas atenuadas como vacunas, que al ser administradas por la misma vía que la de la infección natural podrían inducir no sólo inmunidad humoral sino también celular antibacteriana.

Por lo tanto, esta investigación propone aislar mutantes auxótrofas (con fenotipo *aro*) estables y atenuadas por medio de la inserción de un elemento transponible en el genoma de *S. aureus*. Tales mutantes podrían ser inmunogénicas luego de la aplicación local en un modelo murino de infección intramamaria. La *aro* deficiencia conferiría una atenuación de la virulencia, puesto que las mutantes *aro* replicarían de manera limitada por la escasa disponibilidad de ácido *p*-aminobenzóico en los tejidos de los mamíferos. Asimismo, la estimulación antigénica local de las mucosas producida por la replicación limitada de las mutantes *aro* induciría una respuesta inmune protectora hacia todo tipo de antígenos, incluso los que son sintetizados sólo *in vivo*. Claramente, en lo que al desarrollo de una vacuna se refiere, el diseño final de una cepa atenuada de *S. aureus* para ser utilizada como vacuna viva dependerá de las características genotípicas y fenotípicas de mayor incidencia en el medio donde la vacuna habrá de aplicarse. El trabajo propuesto contribuirá con información básica que podrá ser aplicada al desarrollo de una vacuna para prevenir la mastitis estafilocócica de los bovinos de nuestro país.

1.6 Objetivos específicos

Dado que se desconoce la situación epidemiológica de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de vacas mastíticas, fue necesario investigar los genotipos presentes en el país y causantes de mastitis clínica en los bovinos. Al respecto, debería considerarse el genotipo prevalente causante de la enfermedad en el ganado de Argentina para diseñar una vacuna prototípica. Por este motivo, el primer objetivo fue:

Objetivo 1. Evaluar el genotipo de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de vacas con mastitis clínica de nuestro país mediante dos métodos de tipificación molecular. A tal efecto, se propuso:

- Analizar los perfiles de la macrorrestricción genómica y separación de los fragmentos por electroforesis en campos pulsados (MECP) correspondientes a los aislamientos clínicos bovinos.
- Tipificar los aislamientos clínicos bovinos mediante el polimorfismo genómico de los operones ribosomales (ribotipificación).
- Identificar los genotipos prevalentes aplicando ambos métodos moleculares de tipificación.
- Determinar la concordancia entre la MECP y la ribotipificación.
- Establecer la distribución de las cepas prevalentes.

Debido a que es necesario diferenciar fehacientemente el genoma de la cepa vacuna del genoma de los aislamientos clínicos, el siguiente objetivo específico fue:

Objetivo 2. Identificar las cepas de laboratorio de *S. aureus* que fueron utilizadas como genoma parental. Para ello, se propuso:

- Determinar el poder discriminatorio de la MECP y de la ribotipificación.
- Analizar la similitud de los perfiles de MECP y ribotipificación correspondientes a las cepas de laboratorio y a los aislamientos clínicos bovinos.

Dada la extrema relevancia que se ha atribuido al polisacárido capsular (PC) en la composición de una vacuna para inducir protección contra la infección intramamaria

por *S. aureus*, fue importante determinar el serotipo de PC prevalente en las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis en los bovinos de nuestro país para diseñar un prototipo de vacuna. Por esta razón, el próximo objetivo fue:

Objetivo 3. Determinar la prevalencia del serotipo capsular de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* en nuestro país. Por lo tanto, se propuso:

- Evaluar la expresión del tipo de polisacárido capsular en los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos mastíticos.
- Establecer la distribución geográfica del serotipo capsular prevalente.
- Estudiar la relación clonal entre los aislamientos que expresen el serotipo capsular prevalente.
- Examinar la variación de la prevalencia del PC en el tiempo.

Debido a que las mutantes vivas atenuadas expresarían antígenos que son sólo sintetizados *in vivo* permitiendo una estimulación prolongada del sistema inmune se deseó estudiar la factibilidad de la utilización de mutantes auxótrofas *aro* como inmunógenos para proteger al huésped de la infección de la glándula mamaria por *S. aureus*. En este sentido, se debería tener en cuenta el genotipo y el tipo de polisacárido capsular prevalentes en la población de *S. aureus* de origen bovino de Argentina. Por este motivo, los siguientes objetivos fueron:

Objetivo 4. Obtener y aislar mutantes *aro* de *S. aureus* mediante mutagénesis por transposición. Para ello, se propuso:

- Transformar la cepa parental con el plásmido que porta el transposón Tn917 mediante transducción.
- Obtener una biblioteca de inserciones al azar del transposón en la cepa parental.
- Aislar mutantes dependientes para su crecimiento de los aminoácidos aromáticos (*aro*).

Objetivo 5. Caracterizar el fenotipo auxótrofo de las mutantes *aro* de *S. aureus*.

- Evaluar el crecimiento de las mutantes auxótrofas en medio sólido y líquido.
- Determinar la frecuencia de reversión del fenotipo *aro*.

- Establecer la estabilidad del fenotipo *aro*.

Objetivo 6. Caracterizar las mutantes *aro* de *S. aureus* a nivel molecular.

- Establecer si se produjo una inserción única y al azar del transposón en el genoma de las mutantes *aro*.
- Analizar el sitio de inserción del transposón.
- Identificar el gen afectado por la transposición y causante del fenotipo *aro*.

Objetivo 7. Determinar el grado de atenuación de las mutantes *aro*.

- Establecer la dosis letal 50 (DL₅₀) de las mutantes *aro* en modelos murinos de infección sistémica por inoculación ip e iv de la suspensión bacteriana.
- Determinar la supervivencia de los animales inoculados por vía ip e iv con las mutantes *aro*.
- Analizar la patología de la infección con las mutantes *aro* mediante estudios histológicos.

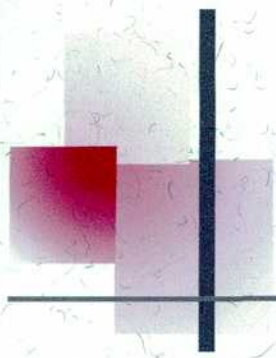
Objetivo 8. Establecer el tiempo de permanencia en tejido de las mutantes *aro* luego de la inoculación por vía ip e iv.

Objetivo 9. Evaluar la capacidad inmunogénica de las mutantes *aro*.

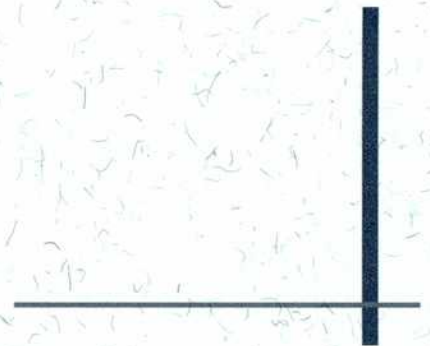
- Determinar la protección sistémica contra el desafío con la cepa parental luego de la inmunización ip con las mutantes *aro*.
- Establecer el grado de protección local que confieren las mutantes *aro* luego de la inmunización intramamaria.

Por el motivo expresado en el objetivo 2, y para identificar el genoma de la mutante *aro* de *S. aureus* de los aislamientos clínicos bovinos, se planteó el último objetivo:

Objetivo 10. Analizar los patrones de MECP y ribotipificación de la mutante respecto de aquellos correspondientes a los aislamientos clínicos.



Materiales y Métodos



2.1 Cepas bacterianas y cultivo

Se utilizaron 195 aislamientos de *S. aureus* obtenidos, entre 1989 y 1996, de leche de bovinos con mastitis de diferentes tambos ubicados en 22 distritos de Argentina. En el total de aislamientos clínicos se evaluó el serotipo capsular. Un grupo de 127 aislamientos se seleccionaron al azar para ser analizados por MECP y ribotipificación. Los aislamientos clínicos bovinos son representativos de la mastitis bovina de Argentina ya que fueron obtenidos de las regiones lecheras más importantes. La especie *S. aureus* fue identificada por los procedimientos microbiológicos estándares (96). Las cepas de laboratorio usadas en este trabajo se listan en la Tabla 1. Todas las cepas se conservaron hasta su uso en caldo cerebro-corazón (CC) con 20% de glicerol y a -20°C . Las bacterias se cultivaron en agar CC. En algunos casos, el medio de cultivo se suplementó con 10 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina (Em) o con 10 $\mu\text{g/ml}$ de cloramfenicol (Cm) (Sigma, St Louis, USA). Cuando correspondió las bacterias se cultivaron en el medio definido mínimo (MDM) para *S. aureus* (153) (Apéndice I).

Tabla 1: Características relevantes de las cepas de *S. aureus* y plásmido utilizados.

Cepas	Características relevantes
Wood	sin cápsula (92)
M	serotipo capsular tipo 1 (106)
Smith	serotipo capsular tipo 2 (92)
Newman	serotipo capsular tipo 5 (92)
Becker	serotipo capsular tipo 8 (92)
8325-4	cepa derivada de la ATCC 8325 curada de profagos; PC5 ⁻ (144)
RN450	8325-4 con profago phi-11 (144)
KSI1024	80CR3 con pTV1 _{ts} ::Tn917(Cm ^R Em ^R) (228)
RN4220	8325-4 r ⁻ m ⁺ (restricción deficiente, modificación positiva); PC5 ⁻ (144)
8325-T	8325-4 con pTV1 _{ts} ::Tn917(Cm ^R Em ^R) (este trabajo)
RN6390	8325-4 hemolítica, cepa parental virulenta (144)
RN6390-T	RN6390 con pTV1 _{ts} ::Tn917(Cm ^R Em ^R) (este trabajo)
Sa306	RN6390 <i>araA</i> ::Tn917(Em ^R Cm ^S) (este trabajo)
Plásmidos	
pTV1 _{ts}	plásmido termosensible (Cm ^R) que porta al transposón Tn917(Em ^R) (228)

2.2 Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratones exocriados de la cepa Swiss de 6-8 semanas de edad. Los animales fueron provistos por el bioterio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Los ratones fueron mantenidos durante los experimentos en condiciones estándar con una dieta de mantenimiento (Nutric, Córdoba, Argentina) y agua corriente acidificada con ClH.

2.3 Extracción de ADN genómico y digestión enzimática

El ADN de las cepas de *S. aureus* se purificó por el método descrito por Pitcher *et al* (159). Brevemente, los protoplastos bacterianos obtenidos luego de la incubación con lisozima (10 mg/ml) y lisostafina (5 mg/ml) (Sigma, St Louis, USA) se lisaron por el agregado de GES (tiocianato de guanidinio 5M, EDTA 0,1 M, *N*-laurilsarcosin 0,5%). Transcurridos 10 min, se adicionó acetato de amonio 7,5 M en hielo. Las proteínas se extrajeron con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y posterior centrifugación. El ADN se precipitó con isopropanol frío y se suspendió en buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) o agua. La cuantificación del ADN extraído se realizó espectrofotométricamente mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm. La digestión enzimática del ADN se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante de la endonucleasa utilizada en cada caso.

2.4 Macrorrestricción genómica y electroforesis en campos pulsados (MECP)

Los aislamientos de *S. aureus* se identificaron por MECP mediante el sistema CHEF DR-III (BioRad, Hercules, USA) siguiendo el protocolo estándar (119). Brevemente, se realizaron cultivos de *S. aureus* y se prepararon los tacos de agarosa. El ADN genómico se digirió con la endonucleasa *Sma*I y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TBE 0,5x durante 18 h a 6 v/cm y a 13°C. El ángulo incluido fue de 120° y los cambios de tiempo inicial y final fueron de 1 y 30 seg, respectivamente. La cepa de *S. aureus* 8325-4 se incluyó en cada gel como control. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con bromuro de etidio y

se analizaron con el sistema BioRad Gel Doc. Para el análisis final se consideraron las posiciones relativas de las bandas y se compararon con el patrón generado por el marcador de peso molecular. Para evaluar la relación clonal entre los aislamientos se aplicaron los criterios de Tenover *et al* (204). Los perfiles de bandas que difirieron en 7 o más bandas se registraron como tipos y se identificaron con una letra mayúscula, mientras que aquellos que difirieron en 2 a 6 bandas se registraron como subtipos diferentes del patrón con más alta prevalencia y se identificaron con una letra mayúscula seguida de un número arábigo.

2.5 Ribotipificación automatizada

Los aislamientos se identificaron por ribotipificación con *EcoRI* usando el sistema automatizado RiboPrint (Qualicon, Wilmington, USA). La ribotipificación se realizó siguiendo el protocolo estándar recomendado por el proveedor (171). Las bacterias fueron cultivadas durante 20 h en agar CC y luego suspendidas en el buffer de preparación de la muestra y calentadas a 80°C por 10 min. Las muestras se corrieron en el mencionado sistema y cada patrón de bandas se definió y comparó con la base de datos de identificación existente. Aquellas que fueron estadísticamente indistinguibles se agruparon dentro del mismo ribotipo (28). Se utilizaron números romanos para identificar cada ribotipo.

2.6 Extracción de ADN plasmídico y digestión enzimática

El ADN plasmídico se aisló mediante lisis alcalina (22) previo tratamiento de la bacteria con lisozima (10 mg/ml) y lisostafina (5 mg/ml) (Sigma, St Louis, USA). El ADN plasmídico se digirió con la endonucleasa apropiada siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en buffer TBE 0,5x. El tamaño molecular de cada banda se estimó por comparación con el marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Promega). Para el análisis de los fragmentos de restricción del ADN plasmídico (REAP) de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* se utilizó la endonucleasa *EcoRI*. Los aislamientos con diferencias de una banda en el perfil de restricción se consideraron

como tipos diferentes y se designaron con una letra P seguida de un número arábigo. Cuando fue necesario, el plásmido pTV1ts (12,4 Kb), se digirió con las endonucleasas *EcoRI* (un único sitio de corte) o *Bgl* II (dos sitios de corte que dan origen a los fragmentos de 10,6 y 1,8 Kb) (Promega, Madison, USA) (228). Éste fragmento de 1,8 Kb se marcó convenientemente y se utilizó como sonda específica del transposón Tn917.

2.7 Marcación de las sondas genómicas

La marcación de las sondas específicas para los genes de polisacárido capsular (*cap5ABCD*, *cap5IJK*, *cap5LMNOP*, *cap8HIJK*) (182) y para el Tn917 (fragmento *Bgl* II de 1,8 Kb) se realizó con digoxigenina utilizando el kit DIG DNA labeling (Boehringer Mannheim). Brevemente, el ADN desnaturalizado se mezcló con hexanucleótidos, dNTPs (con dCTPs marcado), agua y la enzima Klenow. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h. La reacción se detuvo por el agregado de EDTA 0,2 M pH 8. El ADN marcado se precipitó con LiCl 4 M y etanol e incubación a -20°C durante 24 h. Luego de la centrifugación, el pellet se lavó con etanol 70%. El precipitado se secó bien y se suspendió en buffer TE (Tris-ClH 10 mM, EDTA 1 mM pH 8).

2.8 Análisis de similitud, poder discriminatorio y concordancia

La similitud entre los ribotipos fue establecida por el coeficiente de Dice (43). La similitud entre los tipos de MECP fue evaluada por el coeficiente de Nei y Li (134) mediante el programa TREECOM (versión 2.1) para Windows (211). Las matrices resultantes se analizaron por el método de análisis del promedio de pares de grupos no pesados (UPGMA) (191). El índice discriminatorio (D) se calculó utilizando la fórmula descrita por Hunter y Gaston (82). El análisis de concordancia se realizó comparando el número de aislamientos clasificados según MECP y ribotipificación (49, 129) y analizando estadísticamente la independencia de los resultados (197).

2.9 Serotipificación del polisacárido capsular

Se utilizó la técnica de inmunohibridación de colonias con anticuerpos específicos anti-PC5 o PC8 descrita por Lee *et al* (107). Las reactividades de los aislamientos clínicos bovinos se evaluaron por comparación con la reactividad de las cepas de *S. aureus* control (serotipo 1, 2, 5, 8 y no tipificable) incluidas en cada membrana. Las reacciones positivas fueron designadas como 2+ a 4+. Cada aislamiento clínico fue analizado al menos dos veces. Los aislamientos que no reaccionaron a los anticuerpos específicos PC5 y PC8 se definieron como no reactivos (NR).

2.10 Transferencia, hibridación genómica y detección

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel de agarosa se transfirieron a una membrana de nylon cargada positivamente (178). La transferencia se realizó en SSC 10x (ClNa 3 M y citrato de sodio 0,3 M) durante 24 h. Luego, el ADN se fijó a la membrana durante 2 h a 80°C. Posteriormente, la membrana se hibridó durante 24 h a 68°C con la sonda correspondiente marcada con digoxigenina. La detección inmunológica de la sonda se realizó con el anticuerpo específico anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina. Luego de la incubación en oscuridad de la membrana con el sustrato de la enzima se observó la aparición del producto coloreado.

2.11 Transformación por transducción

Se indujo el ciclo lítico del fago phi-11 lisógeno en la cepa de *S. aureus* RN450 utilizando mitomicina C (1 µg/ml) (189). Los lisados del fago phi-11 de alta frecuencia de transductantes se prepararon de las cepas donantes de *S. aureus* (KSI1024 ó RN4220) (183). Las transducciones se realizaron en medio sólido conteniendo Cl₂Ca a una multiplicidad de infección entre 0,5 y 1. El lisado que transportaba el plásmido pTV1ts (proveniente de la cepa KSI1024) se utilizó para infectar la cepa de *S. aureus* RN4220 (intermediaria de transferencia genética). Finalmente, el lisado que llevaba el pTV1ts modificado por metilación (proveniente de la cepa RN4220) se utilizó para transformar las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN6390.

2.12 Mutagénesis por transposición

Luego de establecidas las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y concentración de antibióticos se realizó la mutagénesis por transposición que se detalla a continuación. Las cepas de *S. aureus* 8325-4 ó RN6390 transformadas con pTV1_{ts} se cultivaron a 30°C en caldo CC suplementado con Cm (5 µg/ml) hasta alcanzar una densidad óptica (DO) igual a 0,7. Luego, se efectuó una dilución 1:100 del cultivo en caldo CC suplementado con Em (5 µg/ml) y se incubó a 42°C durante 20 h. Este último procedimiento se repitió 3 veces más. Finalmente, las bacterias precipitadas se suspendieron en caldo CC con 20 % de glicerol y se prepararon alícuotas en viales para su conservación a -70°C. Cada vial correspondió a la "biblioteca de inserciones" de Tn917. A fin de determinar la cantidad de bacterias de la población que acumularon inserciones cromosomales de Tn917, se realizó el recuento de las colonias Em^R presentes en las placas incubadas a 30° y 42°C. La frecuencia de transposición se definió como la razón entre el número de UFC/ml Em^R observadas a 42°C y el número de UFC/ml Em^R observadas a 30°C (68).

2.13 Velocidad de crecimiento de los cultivos en medio líquido

El tiempo medio de generación (TMG) se definió como el tiempo en minutos que tarda el cultivo en duplicar su densidad óptica (DO). Los cultivos se realizaron en 10 ml del medio líquido correspondiente para cada caso, a 37°C y 200 rpm de agitación. Cada 20-30 min se midió espectrofotométricamente la DO a 600 nm. Los valores de DO observados fueron directamente proporcionales a las UFC medidas, demostrándose la viabilidad bacteriana a lo largo del tiempo. El índice de duplicación (id) indica el número de duplicaciones que llevó a cabo la bacteria en las condiciones de cultivo ensayadas. El id se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$id = \frac{\log DO_{\text{final}} - \log DO_{\text{inicial}}}{\log 2}$$

2.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de modo inverso

Inicialmente, se analizó el mapeo del sitio de inserción de Tn917 en el cromosoma de la mutante Sa306 por hibridación con la sonda específica (fragmento de 1,8 Kb de Tn917) de los fragmentos genómicos obtenidos con *Hind*III (Promega, Madison, USA). Esto permitió tener fragmentos de ADN cromosomales flanqueados por una porción del transposón (Figura 14). La región flanqueante derecha se amplificó mediante PCR inversa (209). Brevemente, el ADN genómico de la mutante Sa306 digerido con *Hind*III se autoligó, creándose el plásmido pHIND. Luego, para cada caso, se realizó la reacción de PCR utilizando la enzima *Pfu* polimerasa (Promega, Madison, USA) y 50 pmoles de los cebadores respectivos. Los cebadores fueron diseñados de acuerdo a la secuencia del transposón Tn917 disponible en el GenBank (número de acceso: M11180) usando el programa OLIGO (versión 3.3). Las secuencias nucleotídicas 5'-3' de los cebadores fueron las siguientes: cebador P3 (idéntico a la región 5227-5244 nt del Tn917: GACTTGTTATCTATTCCT), cebador P4 (complementario a la región 4393-4410 nt del Tn917: AACATCGGATTTTAGAGC) y cebador P3bis (idéntico a la región 5485-5503 nt del Tn917: GAAATAATGGAACAAGGA 3'). La amplificación se realizó durante 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min y 72°C por 1 min. El fragmento así amplificado se purificó con el kit PCR Preps DNA (Promega, Madison, USA) para ser secuenciado.

2.15 Secuenciación nucleotídica

La secuenciación fue realizada por el servicio de secuenciación del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (La Plata, Argentina) en un secuenciador automático ADN ABI 373A utilizando el método de Sanger (181). Para la reacción de secuenciación de ambas cadenas del producto de PCR se utilizaron los cebadores específicos P3bis y P4. Las secuencias nucleotídicas se analizaron a fin de determinar la región de ADN incógnita. Luego, la secuencia incógnita se comparó con los bancos de datos del GenBank, The Sanger Centre (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_aureus), University of Oklahoma (<http://www.genome.ou.edu/staph.html>), The Institute for Genome Research (<http://www.tigr.org>) utilizando los programas BlastN y BlastP. La secuencia

aminoacídica deducida se comparó con la base de datos de EMBL utilizando el programa Swiiprot. La alineación de las secuencias aminoacídicas fue generado con el programa ClustalW (versión 1.81) (207).

2.16 Dosis letal 50 (DL₅₀)

Grupos de 8-10 ratones se inyectaron por vía ip o iv con un volumen de 0,5 ml o 0,2 ml, respectivamente, de la suspensión bacteriana con densidades diferentes. La mortalidad de los animales se registró diariamente durante 7 d. Tanto la DL₅₀ por vía ip como iv se calcularon por el método de Reed y Muench (169) recientemente revisado por Welkos y O'Brien (220).

2.17 Modelos de infección sistémica

El modelo de infección sistémica letal se produjo por medio de la inoculación por vía ip de 0,5 ml de la suspensión bacteriana en extracto de levadura al 2% en caldo CC. El modelo de diseminación hematogena se llevó a cabo inoculando 0,2 ml de la suspensión bacteriana por la vena de la cola. En todos los casos, se confirmó el título de la dosis inoculada por medio de diluciones apropiadas de las suspensiones bacterianas en solución fisiológica y plaqueo por duplicado en agar CC.

2.18 Permanencia bacteriana en tejido

A distintos tiempos se sacrificaron por dislocación cervical los animales infectados por vía ip o iv. Inmediatamente antes del sacrificio de los animales se tomaron muestras de sangre del seno retroorbital. Luego, se extrajeron los órganos (bazo y pulmón) de cada animal y se homogeneizaron en 2 ml de agua destilada o Tris-ClHN₄, respectivamente, con ayuda de un homogeneizador mecánico (Potter-Elvehjem). Diluciones apropiadas de los homogenatos se sembraron por duplicado en placas de agar CC, y se cuantificó el número de UFC transcurridas 20 h de incubación. Las muestras de sangre se sembraron con ansa calibrada (10 µl) en placas de agar CC y de

agar salado-manitol. Los resultados se expresaron en UFC/ml y en porcentaje de bacteria depurada al tiempo estudiado, según la siguiente fórmula:

$$[1-(\text{UFC/ml}_{\text{finales}} / \text{UFC/ml}_{\text{iniciales}})] \times 100.$$

2.19 Estudios histopatológicos

Luego de la inoculación bacteriana por vía iv se extirparon a diferentes tiempos, los órganos de los ratones infectados según el procedimiento previamente descrito. Los explantos se fijaron en formalina al 10% y se realizaron posteriormente las técnicas histológicas convencionales. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se observaron al microscopio óptico.

2.20 Producción de mieloperoxidasa (MPO)

Los pulmones se homogeneizaron en Tris-ClNH₄ y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente a fin de lisar los eritrocitos. Luego, se centrifugaron y el pellet celular se suspendió en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. Se conservaron a -20°C hasta el momento del procesamiento. Los homogenatos se sonicaron para la disrupción celular durante 30 seg a 70 watts. Las muestras se centrifugaron y se conservaron los sobrenadantes para la posterior determinación de MPO. La reacción se inició por adición de una alícuota del sobrenadante a 980 µl de la solución de reacción (PBS, N,N'-dimetilformamida (DMFA), H₂O₂ 15 mM, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina 20mM en DMFA y buffer fosfato 200 mM pH 5,4) y se leyó la absorbancia a 655 nm por 2 min. Se define una unidad de MPO como la cantidad de enzima que produce un cambio de absorbancia de 0,10/min a 655 nm (10).

2.21 Protección sistémica

Grupos de 8-10 ratones se inmunizaron por vía ip con 0,2 ml de 10⁷ UFC/ratón de la mutante S_a306. Los animales recibieron 3 inóculos espaciados entre ellos por una semana. A los 7 d de la última inmunización, los ratones de los grupos inmunizados y

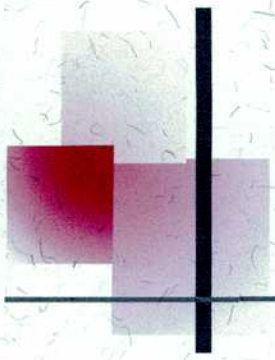
control se desafiaron con la cepa parental RN6390 (5×10^5 UFC/ratón) suspendida en extracto de levadura la 2% en caldo CC. Diariamente, se registró la muerte de los animales. Al mes de realizado el desafío, se sacrificaron los animales supervivientes (56).

2.22 Protección local

Grupos de 10 ratones hembra se anestesiaron con pentobarbital y se inmunizaron con una suspensión de la mutante *Sa306* (5×10^5 UFC/mama) inoculando 50 μ l en las glándulas mamarias número 4 (derecha e izquierda) (56). La primera inmunización se realizó durante la última semana de preñez. Se administró una segunda dosis inmunizante 7 d más tarde (al momento del parto). Los animales control se inocularon por vía ima con 50 μ l de SF estéril. A los 14 d post-parto, todos los animales se desafiaron por vía ima con la cepa parental RN6390 (5×10^5 UFC/mama) o con la cepa de *S. aureus* MB319 aislada de leche mastítica (1×10^6 UFC/mama). A las 96 h del desafío, los ratones se sacrificaron y se extirparon las glándulas mamarias, que se homogeneizaron en 2 ml de agua destilada estéril. Los homogenatos se diluyeron convenientemente y se sembraron en placas de agar CC para recuento cuantitativo.

2.23 Consideraciones estadísticas

Las comparaciones estadísticas de las muestras sin distribución normal se llevaron a cabo por medio del contraste de la suma de rangos de Mann-Whitney usando el programa GraphPad (PRISM, versión 2.0). Para la comparación estadística de proporciones se utilizó el test exacto de Fisher del paquete estadístico EPISTAT. Para contrastar la independencia de los resultados respecto de las condiciones bajo las cuales ellos fueron observados, se utilizó el test para independencia Chi-cuadrado usando el programa GraphPad.



Resultados



OBJETIVO 1

Evaluación genotípica de *S. aureus* aislados de leche de vacas con mastitis clínica de Argentina mediante dos métodos de tipificación molecular

A fin de poder formular estrategias para reducir la diseminación de la infección de la glándula mamaria se estableció la distribución del genotipo prevalente de *S. aureus* en los rebaños de vacas con mastitis clínica. En una primera etapa del trabajo se evaluó la relación clonal entre aislamientos clínicos de *S. aureus* procedentes de leche de vacas mastíticas de distintas cuencas lecheras de Argentina. Para tal fin se escogieron los siguientes métodos moleculares de tipificación: macrorrestricción del genoma con *Sma*I y posterior separación de los fragmentos por electroforesis en campos pulsados (MECP) y ribotipificación automatizada del cromosoma bacteriano digerido con *Eco*RI.

3.1.1 Tipificación de los aislamientos clínicos de *S. aureus* por MECP

El estudio epidemiológico molecular se realizó sobre 127 aislamientos de *S. aureus* provenientes de leche de vacas con mastitis clínica localizadas en 22 distritos del país. Mediante el análisis de los perfiles de bandas del ADN genómico por MECP, se encontraron un total de 24 patrones diferentes (incluyendo tipos y subtipos) con bandas con un peso molecular entre 48,5 y 485 Kb. En base a la tipificación de los resultados de MECP se construyó un dendrograma, tomando en consideración los niveles de similitud según Nei y Li (134) (Figura 1). Considerando un 80% de similitud se definieron 4 grupos, denominados 1, 2, 3 y 4, que incluyeron a los tipos A, B, D y C, respectivamente. De acuerdo a los criterios de Tenover *et al* (204) (descritos en Materiales y Métodos), el análisis de la MECP reveló que 109 de los 127 aislamientos de *S. aureus* (85,8%) pertenecían al grupo 1. Por otro lado, los patrones de bandas de MECP de 44 aislamientos del grupo 1 fueron indistinguibles unos de otros, y entonces se clasificaron como tipo A. El segundo gran grupo de aislamientos con un patrón indistinguible de bandas por MECP fue el subtipo A11, el cual estaba compuesto por 19 aislamientos. Los perfiles de bandas de los aislamientos del tipo A y del subtipo A11 difirieron en 4 bandas (Figura 2). Los 46 aislamientos restantes del grupo 1 se

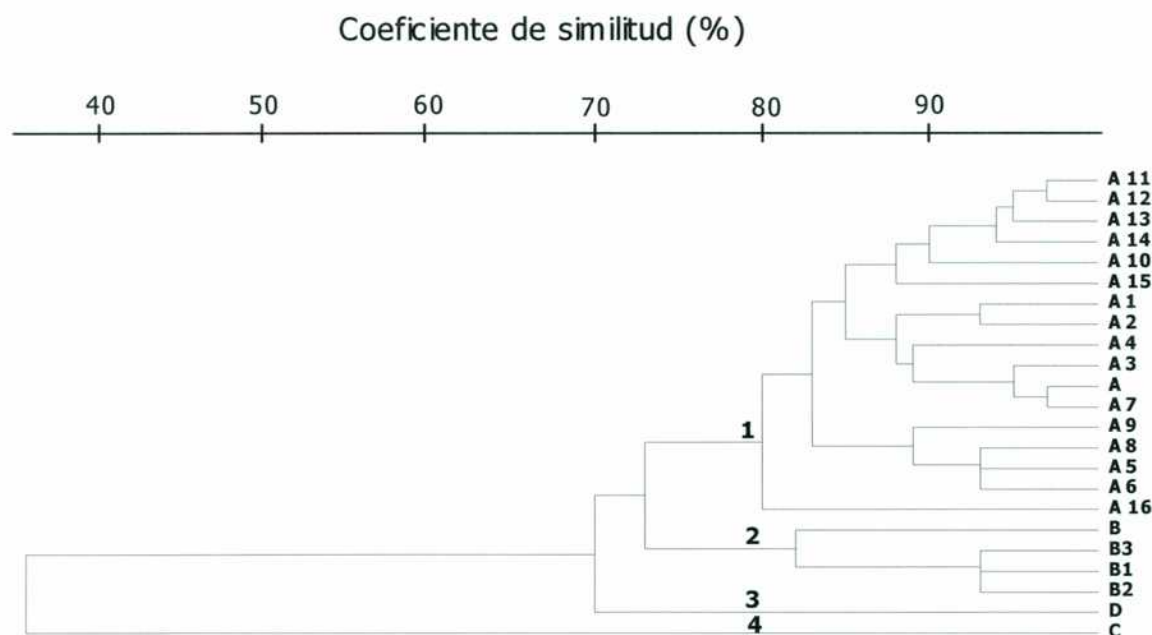


Figura 1: Dendrograma de similitud entre los patrones de MECP de los aislamientos clínicos de *S. aureus*. Los aislamientos fueron agrupados de acuerdo al coeficiente de similitud de Nei y Li por el método del promedio de ligamiento de grupos no pesados mediante el programa Treecom para Windows.

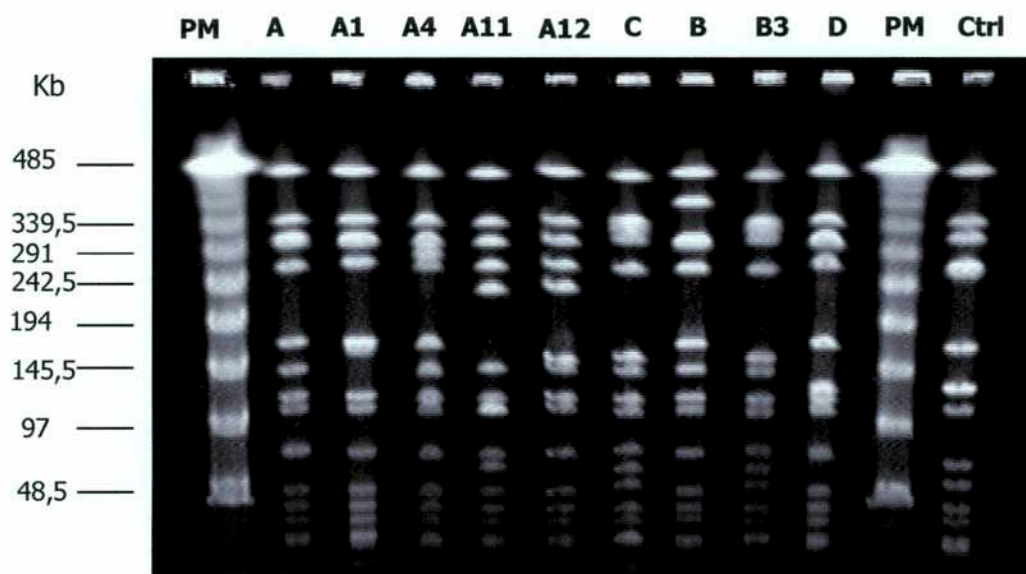


Figura 2: Separación de los fragmentos genómicos de *SmaI* por electroforesis en campos pulsados (MECP). Calles 1 y 11: (PM) ADN del fago Lambda preparado para MECP (Biolabs, New England). Calles 2 a 10: patrones de los tipos y subtipos mayoritarios de MECP correspondientes a los aislamientos clínicos de *S. aureus*. Calle 12: Ctrl (cepa 8325).

distribuyeron eventualmente en 15 subtipos formando grupos de tamaños menores. Catorce de los 127 aislamientos se agruparon dentro del grupo 2 de MECP y se identificaron como tipo B (9 aislamientos) y subtipos B1, B2, y B3 (2, 2 y 1 aislamientos, respectivamente). Finalmente, sólo 2 aislamientos se identificaron en el grupo 3 (tipo D) y otros 2 aislamientos en el grupo 4 (tipo C). En conclusión, más del 85% de los aislamientos clínicos bovinos fueron identificados por MECP en el grupo 1 y el denominado tipo A fue el más prevalente.

3.1.2 Ribotipificación de los aislamientos de *S. aureus*

Los 127 aislamientos de *S. aureus* se tipificaron por medio del método automatizado de caracterización molecular Riboprinter, según se describió en Materiales y Métodos. Mediante un sistema computarizado el patrón de bandas de cada aislamiento se comparó con aquellos existentes en una base de datos. Resultados similares de identificación de especies se obtuvieron por los métodos bioquímicos convencionales y por el método automatizado de ribotipificación. Al considerar un 80% de similitud se definieron ocho grupos (el grupo 3 pertenece a cepas de *S. aureus* de laboratorio; ver sección 3.2.2). Los aislamientos de *S. aureus* incluidos en el estudio se discriminaron por el sistema en 13 ribotipos (Figura 3). Entre ellos, los ribotipos más prevalentes I y VI se constituyeron de 53 y 37 aislamientos, respectivamente. Los 37 aislamientos restantes se distribuyeron eventualmente en 11 grupos de menor tamaño. Los ribotipos mayoritarios I y VI formaron parte del grupo denominado 4.

3.1.3 Identificación de los aislamientos de *S. aureus* por aplicación combinada de ambos métodos moleculares de tipificación

Con el objeto de lograr una mejor diferenciación entre los genotipos obtenidos por MECP y ribotipificación se analizaron los resultados combinando ambos métodos. Por un lado, los 44 aislamientos tipo A de MECP se discriminaron en 4 grupos compuestos de 31, 7, 3 y 3 aislamientos correspondientes a los ribotipos I, II, III y XII, respectivamente. Sin embargo, cuando se analizó el subtipo A11 de MECP (19 aislamientos) por el método de ribotipificación, tal discriminación no se alcanzó. De

hecho, del total de 19 aislamientos A11, 18 pertenecieron al ribotipo VI y sólo el aislamiento A11 restante se identificó como ribotipo VII. Por otro lado, la tipificación por MECP fue útil para proveer una discriminación adicional dentro de los 2 grandes grupos compuestos por aislamientos con ribotipos I y VI. Ciertamente, 31 de los 53 aislamientos con ribotipo I se identificaron como tipo A de MECP. Los 22 aislamientos restantes se discriminaron en 7 subtipos de MECP (A1 a A5, B1 y B2) compuestos de 1 a 5 aislamientos. Similarmente, 18 de 37 aislamientos con ribotipo VI pertenecieron al subtipo A11 de MECP, y los 19 aislamientos restantes se discriminaron en 11 grupos MECP de menor tamaño. En conclusión, mediante el análisis de los resultados por combinación de ambos métodos se establecieron dos genotipos mayoritarios, A/I y el A11/VI, entre los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus*.

3.1.4 Concordancia entre los métodos moleculares de tipificación

Al existir una cierta correspondencia entre el tipo A de MECP y el ribotipo I se evaluó el nivel de concordancia entre la MECP y la ribotipificación. Para ello se compararon por MECP y ribotipificación los 127 aislamientos clínicos de *S. aureus* y se clasificaron de acuerdo a: i) si el aislamiento presentó un tipo idéntico o diferente al denominado A de MECP y ii) si presentó el ribotipo I u otro distinto (Tabla 2). En el total de 127 aislamientos, el 24% de los aislamientos con tipo A de MECP presentaron ribotipo I y el 48% de los aislamientos con tipos de MECP diferentes de A mostraron ribotipos distintos de I. El porcentaje total de resultados concordantes fue 72,4% y fue

Tabla 2: Análisis de la concordancia entre MECP y ribotipificación

Número de aislamientos (proporción del total de comparaciones) con:		
Ribotipo I		
Tipo A de MECP	Igual	Diferente
Igual	31 (0,24)	13 (0,11)
Diferente	22 (0,17)	61 (0,48)
Concordancia*	72,4%	

* Concordancia es igual a la suma de 31 y 61, expresada como porcentaje del total de 127 aislamientos.

altamente significativo (Chi cuadrado de independencia, $X^2=22,8$, $df=1$, $p<10^{-6}$). Por lo tanto, existió una asociación entre la identidad clonal de los aislamientos tipo A de MECP y ribotipo I. Similares resultados se establecieron cuando se evaluó la asociación al azar del subtipo A11 de MECP y el ribotipo VI (Tabla 3). En el total de 127 aislamientos, el 14% de los aislamientos con subtipo A11 de MECP presentaron ribotipo VI y el 70% de los aislamientos con tipos de MECP diferentes de A11 mostraron ribotipos distintos de VI. El porcentaje total de resultados concordantes fue 84,2% y

Tabla 3: Análisis de la concordancia entre MECP y ribotipificación

Número de aislamientos (proporción del total de comparaciones) con:		
Ribotipo VI		
Subtipo A11 de MECP	Igual	Diferente
Igual	18 (0,14)	1 (0,01)
Diferente	19 (0,15)	89 (0,70)
Concordancia*	84,2%	

* Concordancia es igual a la suma de 18 y 89, expresada como porcentaje del total de 127 aislamientos.

fue altamente significativo (Chi cuadrado de independencia, $X^2=46,5$, $df=1$, $p<10^{-6}$). Por consiguiente, existió una asociación entre la identidad clonal de los aislamientos con subtipo A11 de MECP y ribotipo VI. Por lo tanto, hubo una buena correlación entre los dos métodos de tipificación, con un 72,4% y 84,2% de concordancia en la clasificación de los genotipos de los aislamientos estudiados. En otras palabras, ambos métodos coincidieron en la identificación de dos genotipos característicos y mayoritarios entre los aislamientos bovinos de *S. aureus* estudiados.

3.1.5 Distribución de las cepas A/I y A11/VI de *S. aureus*

A fin de establecer si los genotipos mayoritarios hallados se encontraban concentrados en una región determinada se analizaron los resultados considerando la fecha y ubicación geográfica de los aislamientos clínicos de *S. aureus*. La cepa mayoritaria con genotipo A/I (definido por MECP y ribotipificación), se halló

extensamente distribuida en el país. Ciertamente, 31 cepas con genotipo A/I se hallaron en 15 de las 22 localidades estudiadas. Asimismo, el segundo genotipo más prevalente A11/VI también se encontró ampliamente distribuido entre localidades distantes del país. Una considerable variación genotípica se observó en los aislamientos provenientes de diferentes rebaños dentro de cada distrito. Once cepas con genotipos diferentes se aislaron de un total de 22 aislamientos del distrito La Vacherie, mientras que 14 genotipos distintos se encontraron en un total de 20 aislamientos del distrito de Brandsen. Asimismo, entre 6 aislamientos recolectados del distrito de Brandsen en un período de 2 meses se observaron 6 genotipos diferentes definidos por MECP y ribotipo. Similarmente, 6 cepas con genotipos distintos se identificaron entre 7 aislamientos del distrito de La Vacherie obtenidos dentro de un período de 4 meses. En resumen, los dos genotipos mayoritarios se hallaron extensamente distribuidos en el país y no estuvieron concentrados en una única región o en regiones muy próximas.

Cuando la totalidad de las localidades se estudiaron en conjunto se observó que la prevalencia de las cepas A/I y A11/VI varió considerablemente en el período de tiempo investigado (Figura 4). Similares resultados se establecieron entre los aislamientos de 2 localidades (20 de Brandsen y 22 de La Vacherie) ubicadas a aproximadamente 1100 Km de distancia. El análisis de los genotipos a través del tiempo reveló que la cepa A/I se encontró de 1989 (alta prevalencia) a 1994 (baja prevalencia) en La Vacherie y de 1989 (alta prevalencia) a 1996 (baja prevalencia) en Brandsen. La segunda cepa más prevalente (A11/VI) se aisló de 11 localidades diferentes de 1990 (baja prevalencia) a 1996 (alta prevalencia). Por lo tanto, durante el período estudiado se estableció una fluctuación en el predominio de los dos genotipos mayoritarios.

3.1.6 Tipificación de los aislamientos de *S. aureus* por restricción del ADN plasmídico

El uso combinado de la MECP y la ribotipificación permitió la definición de dos clones predominantes, denominados A/I y A11/VI. Con el objeto de lograr una identificación mejor entre las cepas correspondientes a dichos genotipos, se analizaron

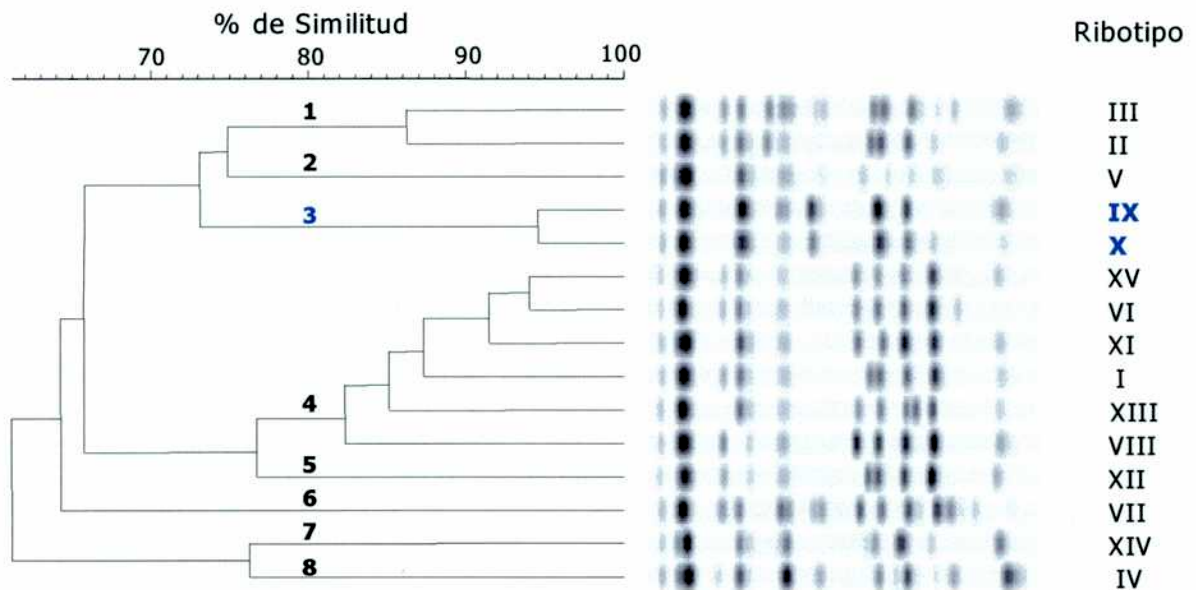


Figura 3: Dendrograma de similitud sobre la base de la ribotipificación automatizada y perfiles digitalizados de los ribotipos. El dendrograma muestra la relación genética que existe entre los aislamientos clínicos bovinos (ribotipos en color negro) y las cepas de laboratorio (ribotipos en color azul). El coeficiente de Dice fue utilizado para calcular la similitud (43).

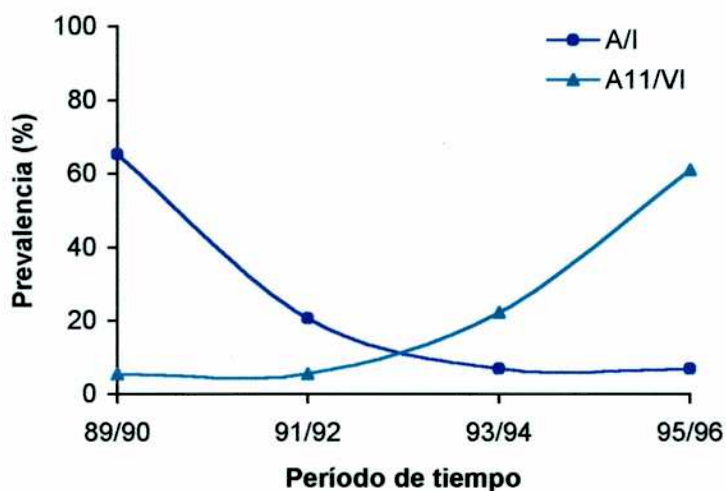


Figura 4: Prevalencia de las cepas A/I y A11/VI de MECP. Considerando el conjunto de localidades se determinó el número de aislamientos clínicos con genotipos A/I y A11/VI a lo largo del tiempo.

los patrones de restricción enzimática del ADN plasmídico (REAP). A fin de evitar diferencias atribuibles a la inestabilidad plasmídica, se investigó por REAP aquellos aislamientos obtenidos dentro de un período máximo de 5 meses. Teniendo en cuenta tal consideración se seleccionaron 2 grupos de cepas A/I y A11/VI, respectivamente. En 11 cepas A11/VI procedentes de 8 distritos se estableció la presencia de ADN plasmídico. Los correspondientes patrones de REAP fueron diferentes para cada una de las cepas A11/VI. Cada perfil consistió en 3 a 11 bandas entre 9500 y 650 pb de peso molecular (Figura 5). Cabe señalar que en 3 cepas A11/VI obtenidas de diferentes rebaños de un mismo distrito se observaron 3 patrones de REAP distintos. En un período de 4 meses, la evaluación de 14 cepas A/I obtenidas de 9 localidades permitió la identificación de 6 perfiles de REAP, los cuales no coincidieron con aquellos encontrados entre las cepas A11/VI estudiadas. Estos perfiles exhibieron de 2 a 11 bandas entre 900 y 18000 pb de peso molecular (Figura 5) y una de las cepas A/I no llevaba plásmido. Por otro lado, se diferenciaron por los perfiles de REAP dos grupos de 3 y 2 cepas A/I de 2 distritos (La Vacherie y Tandil), respectivamente. Contrariamente, 2 cepas A/I de Brandsen (REAP tipo P15) y 2 cepas de Bolívar (REAP tipo P14), respectivamente, no fueron discriminadas unas de otras. Considerando los resultados obtenidos por medio del análisis de los patrones de REAP se logró una identificación mejor entre los aislamientos con idéntico genotipo por MECP y ribotipo.

3.1.7 Conclusiones parciales

De acuerdo con los resultados descriptos se identificó por medio del análisis de MECP un grupo mayoritario (grupo 1) entre los aislamientos de origen bovino de *S. aureus*. Este grupo incluyó al 85,5% de los aislamientos de *S. aureus* estudiados. Se identificaron dos clones (A/I y A11/VI) predominantes en Argentina que correspondieron al 39% de los aislamientos. La MECP y la ribotipificación concordaron en la identificación de ambos genotipos prevalentes. Por otro lado, dentro de un período de 8 años se estableció un pico de prevalencia de la cepa A/I seguido por una marcada disminución en el predominio de ese genotipo y un simultáneo incremento en la prevalencia de la cepa A11/VI. A pesar de este cambio en la prevalencia, el genotipo A/I se encontró en la totalidad del período de tiempo en que se llevó a cabo el estudio.

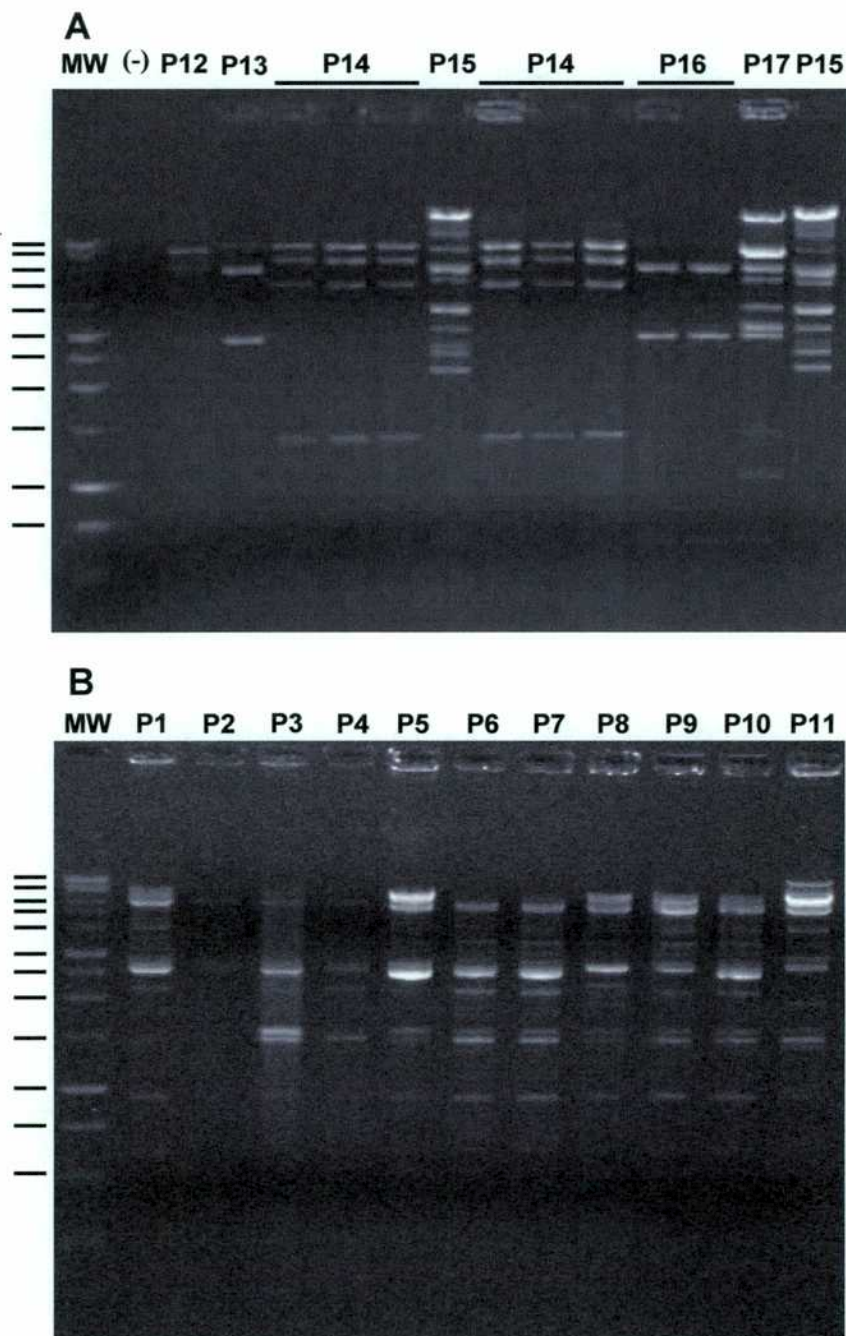


Figura 5: Electroforesis del AND plasmídico digerido con *EcoRI*. **A:** tipos de REAP de 14 aislamientos clínicos de *S. aureus* con genotipo A/I; **B:** tipos de REAP de 11 aislamientos clínicos de *S. aureus* con genotipo A11/VI. Las cepas analizadas se aislaron de leche de bovinos con mastitis en un período de 5 meses. (-) Ausencia de plásmido. PM: marcador de peso molecular (AND fago Lambda digerido con *HindIII*)

Por medio del análisis de los patrones de REAP se logró discriminar un grupo de cepas A/I y A11/VI recolectadas con una diferencia de pocos meses. En vista de los resultados obtenidos se estableció que existieron dos genotipos prevalentes en el período estudiado que estaban, además, distribuidos por todo el país. Por lo tanto, para el diseño de una vacuna que prevenga la mastitis en bovinos se deberá tener en cuenta para un determinado período, el genotipo mayoritario existente en la población de *S. aureus* causantes de tal enfermedad.

OBJETIVO 2

Identificación de las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN6390 entre los aislamientos clínicos

Una de las mayores inquietudes cuando se utiliza una vacuna viva atenuada es la posibilidad de que nuevos casos de la enfermedad puedan ser causados por cepas derivadas de la vacuna. Por cierto, el genoma de la cepa vacuna tiene que ser fácilmente reconocido del genoma de los aislamientos clínicos para asegurar si la aparición de casos nuevos de infección fueron debidos a la vacunación. Por lo tanto, con el objeto de contar con un método que identifique inequívocamente a la cepa vacuna de los aislamientos clínicos, se investigaron por MECP y ribotipificación automatizada las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN6390 junto a los aislamientos clínicos bovinos. En esta etapa del trabajo se incluyeron las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN6390 que se utilizarán en una serie de experimentos posteriores como genoma parental de la cepa vacuna prototípica.

3.2.1 Poder discriminatorio de los métodos moleculares de tipificación

El índice discriminatorio (ID) se aplicó para comparar la capacidad de los métodos moleculares de tipificación para diferenciar entre cepas epidemiológicamente no relacionadas. Para la estimación del ID se recolectaron 21 aislamientos de *S. aureus* originarios de tambos diferentes de 3 distritos (Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos) de

nuestro país. Aplicando la fórmula de Hunter y Gaston (82) se obtuvo un ID de 0,91 para la MECP, siendo el de la ribotipificación automatizada de 0,69.

3.2.2 Diferenciación de las cepas de laboratorio de *S. aureus*

A fin de diferenciar el genoma parental de una posible cepa vacuna se analizaron los patrones de MECP de las cepas de laboratorio y de los aislamientos clínicos bovinos. Las cepas de *S. aureus* RN6390 y 8325-4 (Tabla 1) se identificaron con los tipos Q1 y Q2, respectivamente. Ambos genotipos demostraron ser marcadamente diferentes cuando se los comparó con aquellos obtenidos de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* (Figura 6). Los perfiles de MECP correspondientes a RN6390 (Q1) y 8325-4 (Q2) difirieron en 3 bandas lo que confirmó la muy cercana relación genética entre ambas cepas. Asimismo, el patrón de bandas de las cepas de laboratorio difirió en más de siete bandas respecto al perfil de MECP establecido para cada aislamiento. Por lo tanto, de acuerdo a los criterios de Tenover *et al* (204) las cepas RN6390 y 8325-4 son genéticamente diferentes del resto de los aislamientos. Más aún, el análisis por similitudes reveló que las cepas de laboratorio se identificaron en un único grupo, denominado 5, que mostró tener una disimilitud importante con respecto a los otros grupos (Figura 7). Mediante la ribotipificación automatizada se logró una buena diferenciación de las cepas de laboratorio a pesar del moderado poder discriminatorio observado (Figura 3). Por lo tanto, la identificación del genoma parental de una posible cepa vacuna pudo ser inequívocamente diferenciado de los aislamientos clínicos bovinos del área en estudio.

3.2.3 Conclusiones parciales

Sobre la base de los resultados obtenidos mediante la MECP y ribotipificación automatizada se logró una inequívoca identificación de las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN6390 del resto de los aislamientos clínicos bovinos. Los métodos moleculares de tipificación utilizados demostraron ser útiles para diferenciar la base genómica de una posible cepa vacuna.

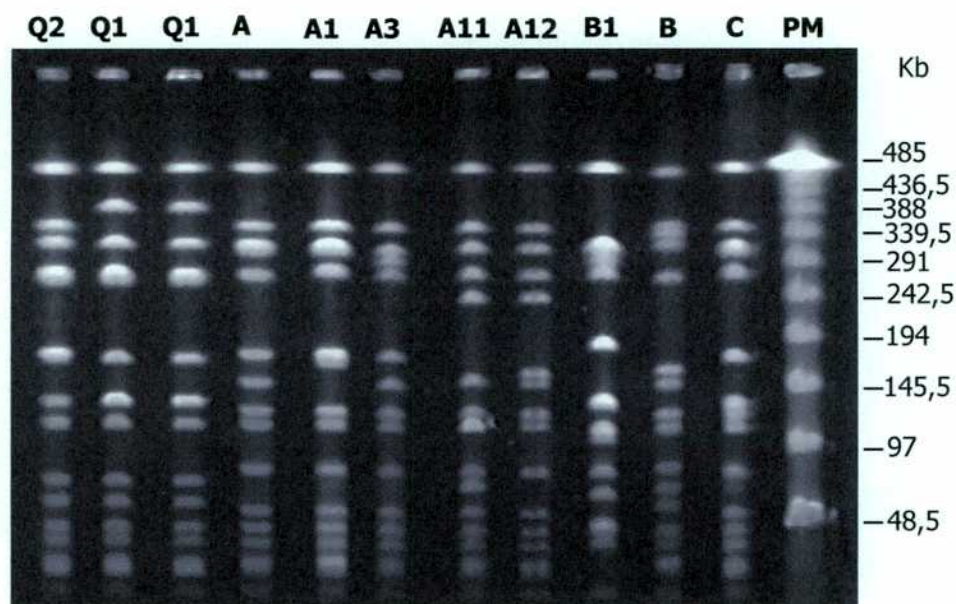


Figura 6: Separación de los fragmentos genómicos de *Sma*I por electroforesis en campos pulsados (MECP). *Calle 1:* cepa de *S. aureus* 8325-4 (tipo Q2). *Calle 2:* cepa de *S. aureus* RN6390 (tipo Q1). *Calle 3:* mutante *Sa*306 (tipo Q1). *Calles 4 a 8:* aislamientos clínicos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis (tipos mayoritarios: A, A1, A3, A11, A12, B, B1 y C). *Calle 12:* marcador de peso molecular (ADN del fago Lambda preparado para MECP).

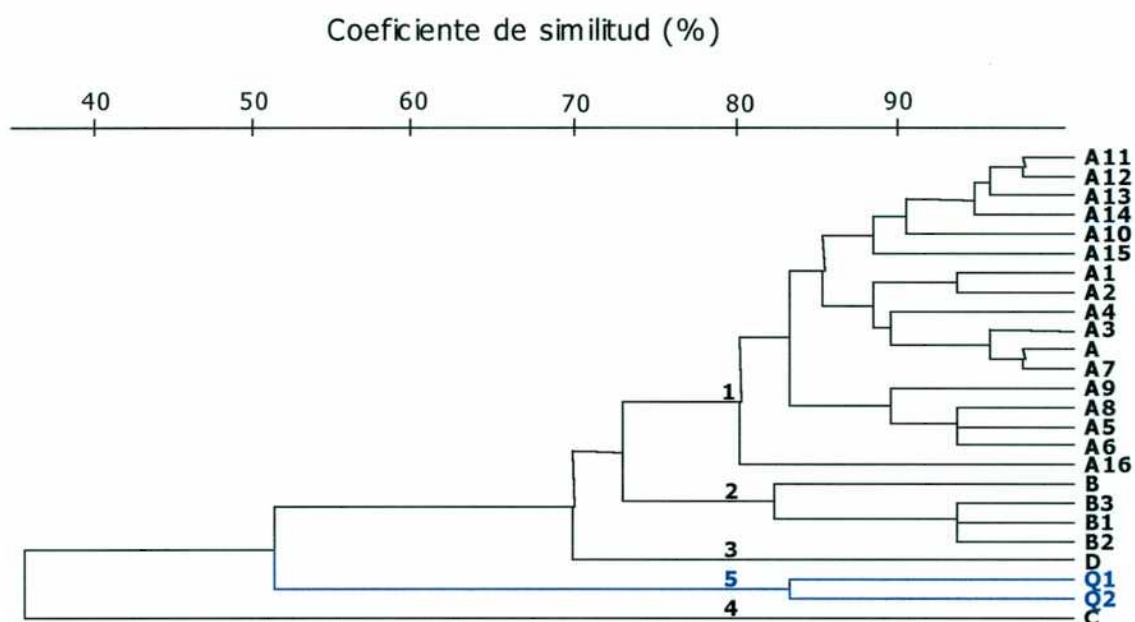


Figura 7: Dendrograma de similitud entre los patrones de MECP de los aislamientos clínicos de *S. aureus* y las cepas de laboratorio. El análisis se realizó mediante el coeficiente de similitud de Nei y Li y el método de promedio de ligamiento de grupos no pesados (Treecom para Windows). *Tipo Q1:* mutante *Sa*306 y cepa parental RN6390 (en azul); *tipo Q2:* 8325-4 (en azul); *tipos restantes:* aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* (en negro).

OBJETIVO 3

Expresión del serotipo capsular de aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* de Argentina

Dada la importancia de la cápsula como componente fundamental en las vacunas propuestas para prevenir las infecciones por *S. aureus* (105, 109, 110) se consideró importante conocer el tipo de PC que se encuentra presente en la población bacteriana en bovinos. Posteriormente, esta información deberá ser tenida en cuenta en el diseño de vacunas que prevengan la mastitis en bovinos de Argentina. En esta etapa del trabajo se evaluó la expresión del tipo de PC por los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis clínica. Para tal fin se estableció la prevalencia de los serotipos 5 (PC5) y 8 (PC8) de la cápsula polisacarídica y se estudió la relación clonal entre los aislamientos.

3.3.1 Tipificación del polisacárido capsular y prevalencia

Mediante la utilización de anticuerpos específicos anti-PC5 y PC8 se evaluó la reactividad de 195 aislamientos clínicos de *S. aureus*. La expresión del PC5 se observó en 14 de los 195 aislamientos (7,1%), mientras que el PC8 se registró en 13 de los aislamientos (6,6%). Sorprendentemente, se observó que los 168 aislamientos (86,3%) restantes no reaccionaron con los anticuerpos específicos anti-PC5 o PC8. Por lo tanto, en esos casos los aislamientos se clasificaron como no reactivos (NR). Los 14 aislamientos que expresaron el serotipo 5 de PC se encontraron en 9 distritos y los 13 aislamientos con serotipo 8 de PC se hallaron en 8 de los 22 distritos investigados. Sólo en cuatro localidades se registró el solapamiento de los tipos capsulares 5 y 8 (Tabla 4). Las cepas de *S. aureus* NR se aislaron en la gran mayoría de los distritos (21 de 22).

Por otro lado, se realizaron experimentos de hibridación genómica a fin de establecer si las cepas NR portan los genes involucrados en la síntesis de la cápsula polisacarídica tipo 5 u 8. Para tal fin, se utilizaron las siguientes sondas de ADN específicas: *cap5*ABCD (correspondiente a la región del extremo 5' conservada entre los serotipos 1, 2, 5 y 8), *cap5*LMNOP (correspondiente a una región común de *cap5* y

cap8), *cap5LJK* (correspondiente a una región específica de *cap5*) y *cap8HIJK* (correspondiente a una región específica de *cap8*). Para el estudio, se eligieron 8 aislamientos NR y sin relación epidemiológica alguna. Sólo 3 de los 8 aislamientos hibridaron con las sondas *cap5ABCD*, *cap5LMNOP* y *cap5LJK* (Tabla 5).

Tabla 4: Distribución de aislamientos de *S. aureus* productores de PC5 y PC8 en 22 distritos de Argentina.

Distrito	N° de aislamientos			
	Total	PC5	PC8	NR
Ameghino	6	1		5
América	1			1
Basavilbaso	4	1		3
Bolívar	11		5	6
Brandsen	20	2	1	17
Cañuelas	1		1	0
Entre Ríos	4		1	3
French	2			2
General Rodríguez	10			10
Gauleguaychú	14		1	13
La Delia	4			4
La Vacherie	22	3	2	17
Las Heras	11	2		9
Lincoln	14			14
Luján	20	2	1	17
Mercedes	3			3
Nueve de Julio	8	1		7
Olavarría	6			6
Rafaela	8			8
San Francisco	1			1
Tandil	19	1	1	17
Tres Arroyos	6	1		5
Total	195	14	13	168

En vista de los resultados observados se sugiere que estos 3 aislamientos poseen el grupo de genes *cap5* aunque no expresaron niveles detectables del PC5. Los 5 aislamientos NR restantes no hibridaron con ninguna de las sondas utilizadas, indicando que ellos no portan genes similares a los de la síntesis de los tipos 1, 2, 5 u 8 del PC

(Tabla 5). Por otro lado, cuando se utilizó la sonda específica para el tipo 8 de PC (*cap8*H₁IJK) sólo hibridó la cepa Becker utilizada como control positivo. Ninguno de los 8 aislamientos NR hibridó con la sonda específica para CP8. Resumiendo, se observó que sólo 3 de los 8 aislamientos NR poseen el grupo de genes *cap5*, mientras que los aislamientos restantes fallaron para hibridar con el locus *cap5* o *cap8*.

Por lo tanto, se estableció que la mayoría de los aislamientos clínicos estudiados fueron NR, siendo la prevalencia de PC5 y PC8 menor al 10% en cada caso. Por otro lado, los genes responsables de la expresión del PC5 estuvieron presentes en 3 de los 8 aislamientos NR estudiados. Los 5 aislamientos restantes no presentaron ningún gen similar a los responsables de la síntesis de los serotipos 1, 2, 5 u 8 de PC. En conclusión, los serotipos 5 y 8 de PC podrían no ser buenos candidatos para formar parte de una vacuna que prevenga la mastitis bovina en Argentina.

Tabla 5: Hibridación del ADN genómico de cepas NR de *S. aureus* con fragmentos de genes *cap*.

Distrito	Cepa	Tipo PC	Hibridiza con*:		
			<i>Cap5</i> ABCD	<i>Cap5</i> IJK	<i>Cap5</i> LMNOP
Control (lab.)	Becker	8	+	-	+
Control (lab.)	Newman	5	+	+	+
Basavilbaso	MB 067	NR			
San Francisco	MB 3-996	NR	+	+	+
Brandsen	MB 101	NR	+	+	+
Rafaela	MB 2-1790	NR			
Olavarría	MB 327	NR			
Lincoln	MBD 014	NR			
Tres Arroyos	MB 099	NR			
Tandil	MB 319	NR	+	+	+

* Ninguno de los aislamientos NR hibridó con la sonda *cap8*H₁IJK (específica del PC8)

3.3.2 Relación clonal entre los aislamientos de *S. aureus* que expresan PC

Con el objeto de establecer la relación clonal entre los aislamientos clínicos de *S. aureus* con diferentes serotipos capsulares se analizaron los patrones de MECP. Para ello, se seleccionaron los 27 aislamientos PC5 y PC8, más 100 aislamientos NR elegidos al azar. Ocho de los 14 aislamientos de *S. aureus* con PC5 obtenidos entre 1989 y 1992 se identificaron como tipo A (Tabla 6). Por otro lado, se deseó establecer si el PC5 estaba asociado al azar con el tipo A de MECP. Para ello, el número de aislamientos PC5 con tipo A/número total de aislamientos PC5 (8/14) se comparó con el número de aislamientos con tipo A/número total de aislamientos (39/94). Mediante la evaluación estadística se demostró que hubo una asociación al azar entre el tipo A de MECP y la expresión de PC5 ($p=0.387$, test exacto de Fisher). Los 8 aislamientos que expresaron el PC5 y que se identificaron como tipo A de MECP se encontraron en 6 localidades distantes.

Asimismo, 75 aislamientos obtenidos entre 1990 y 1994 se estudiaron por MECP. Nueve de ellos se identificaron como tipo B de MECP y ocho de ellos expresaron PC8. Siguiendo el mismo razonamiento descrito arriba para los aislamientos de *S. aureus* con PC5, el número de aislamientos tipo B y PC8/número total de aislamientos PC8 (8/13) se comparó con el número de aislamientos tipo B/números total de aislamientos analizados por MECP (9/75). Por medio del análisis estadístico se estableció una diferencia significativa ($p=0.0003$, test exacto de Fisher), la cual indicó que la expresión del PC8 estaría asociada con el tipo B de MECP. Por otro lado y siguiendo el mismo razonamiento se demostró que en 36 de los 127 aislamientos, el tipo A de MECP se encontró asociado al azar con el fenotipo capsular NR ($p>0,5$; test exacto de Fisher). Asimismo, no se estableció ninguna dependencia del fenotipo capsular NR con un tipo de MECP dado, localización o tiempo bajo estudio. Se puede concluir entonces que en el período estudiado que el tipo A de MECP no se halló asociado a la expresión del PC5 ni al fenotipo capsular NR. Por el contrario, el tipo B de MECP se encontró asociado a la expresión de PC8. La asociación clonal se observó entre uno de los tipos de MECP minoritarios y el también poco frecuente PC8.

3.3.3 Variación de la prevalencia del PC en el tiempo

Durante el período de 1989 a 1997, las cepas de *S. aureus* que expresaron PC5 o PC8 no estuvieron igualmente representadas (Tabla 7). En el período 1989-1990, la prevalencia de aislamientos con serotipo 5 decreció del 15,9% del total de 69 aislamientos al 0% del total de 30 aislamientos en el período 1993-1994. Contrariamente, la prevalencia de los aislamientos con serotipo 8 fue 1,5% en 1989-1990, aumentó a 16,7% en 1993-1994 y disminuyó a 0% de allí en adelante.

Tabla 6: Aislamientos de *S. aureus* con reacción positiva hacia los anticuerpos anti-PC5 o anti-PC8 en ensayo de inmunohibridación.

Cepa	Distrito	Fecha (mes/año)	Tipo PC	Tipo MECP
MB 320	La Vacherie	3/90	5	A
MB 113	Tres Arroyos	4/90	5	A
MB 339	Las Heras	4/90	5	A
MB 304	Ameghino	10/89	5	A
MB 305	9 de Julio	11/89	5	A
MB 337	La Vacherie	4/90	5	A
MB 313	Brandsen	11/89	5	A
MB 334	La Vacherie	4/90	5	A
MB 311	Las Heras	11/89	5	A2
MBb 18	Brandsen	3/92	5	A2
MB 094	Tandil	11/89	5	A16
Mba 3	Basavilbaso	6/91	5	B3
MB 111	Luján	4/90	5	D
MBb 35	Luján	8/92	5	D
MBb 13	Bolívar	3/92	8	A1
MB 008	Cañuelas	5/94	8	A1
MBC 212	Gualeduaychú	6/94	8	A13
MB 019	Luján	6/94	8	B
MB 107	Bolívar	2/90	8	B
MBa 12	Entre Ríos	11/91	8	B
MBb 11	La Vacherie	2/92	8	B
MBb 19	Brandsen	3/92	8	B
MBb 22	Bolívar	4/92	8	B
MB 018	Bolívar	6/94	8	B
MB 022	Bolívar	6/94	8	B
MB 451	Tandil	6/91	8	C
MBa 004	La Vacherie	7/91	8	C

La prevalencia de los aislamientos NR no varió marcadamente desde 1989-1990 a 1997. Los aislamientos que se determinaron indistinguibles unos de otros por sus tipos de PC y tipos de MECP se encontraron en la misma localidad sobre un período de varios años. Como en el caso de los aislamientos que expresaron PC8 y tipo B de MECP, los cuales persistieron en animales infectados del distrito de Bolívar sobre un período de 4 años. Por lo tanto, los aislamientos clínicos bovinos que expresaron PC5 o PC8 no se encontraron homogéneamente distribuidos en el tiempo del estudio. Por el contrario, los aislamientos con fenotipo capsular NR estuvieron igualmente representados durante el mismo período.

Tabla 7: Prevalencia en el tiempo de los serotipos 5 y 8 de PC

Período	Número (%) de aislamientos			
	Total	PC5 ^a	PC8 ^b	NR
1989-1990	69 ^c	11 (15,9)	1 (1,5)	57 (82,6)
1991-1992	47	3 (6,4)	7 (14,9)	37 (78,7)
1993-1994	30	0	5 (16,7)	25 (83,3)
1995-1996	35	0	0	35 (100)
1997	14	0	0	14 (100)
Total	195	14	13	168

^a La disminución en la prevalencia de los aislamientos PC5 de 1989-1990 a 1993-1994 (11/69 a 0/30) fue significativa ($p=0,014$, test exacto de Fisher).

^b El aumento en la prevalencia de los aislamientos PC8 de 1989-1990 a 1991-1992 (1/68 a 7/40) fue significativo ($p=0,007$, test exacto de Fisher). Luego, la prevalencia de los aislamientos PC8 de 1991-1992 decreció significativamente en 1995-1996 (7/40 a 0/35) ($p=0,0017$, test exacto de Fisher).

^c Cuarenta y cuatro aislamientos de 1989 más 25 aislamientos de 1990.

3.3.4 Conclusiones parciales

En los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de vacas con mastitis se observó una muy baja prevalencia (14%) de los serotipos 5 y 8 de PC. Por otro lado, la prevalencia de aislamientos de *S. aureus* NR fue sorprendentemente alta. En tres de ellos se demostró la presencia de los genes para la síntesis del PC5 a pesar de que no expresaron niveles detectables del mencionado serotipo. Por otro lado, se pudo

establecer una asociación al azar entre la presencia del serotipo 5 de PC y el tipo A de MECP. Asimismo, el fenotipo capsular NR fue independiente del tipo A de MECP. Sin embargo, se comprobó estadísticamente que el PC8 se encontró asociado al tipo B de MECP. Estos datos sugieren que podría no tener relevancia la inclusión de los serotipos 5 y 8 de PC en la formulación de una vacuna que prevenga la mastitis bovina en Argentina.

OBJETIVO 4

Obtención y aislamiento de mutantes auxotróficas de *S. aureus* mediante mutagénesis por transposición

Las cepas vivas atenuadas proveen una mejor protección debido a la replicación limitada de la bacteria *in vivo* que induce inmunidad contra el patógeno (53). Diferentes especies bacterianas patógenas han sido atenuadas por introducción de una mutación estable en la ruta biosintética de los aminoácidos, de las purinas y pirimidinas o de la riboflavina. Estas mutantes atenuadas además han sido capaces de estimular inmunidad protectora en diferentes modelos animales (55, 77, 98, 112, 140). Por lo tanto, en esta etapa del trabajo se evaluó la dependencia para el crecimiento de los aminoácidos aromáticos como forma de atenuación de *S. aureus* y su potencial aporte al diseño de una vacuna que prevenga la mastitis en bovinos. Inicialmente, y con el objeto de contar con una cepa viva atenuada de *S. aureus*, se realizaron una serie de experimentos para mutagenizar, aislar y caracterizar las mutantes auxótrofas.

3.4.1 Mutagénesis por transposición con Tn917

El principal riesgo de utilizar mutantes como vacunas vivas es su reversión al fenotipo parental patógeno. Con el propósito de obtener los conocimientos básicos para la posible construcción futura de una mutante auxótrofa por delección, es decir, sin posibilidad de reversión, se utilizó la metodología de mutagénesis por transposición.

3.4.1.1 Ensayos de caracterización

El estudio se inició utilizando la cepa de *S. aureus* 8325-4 (Tabla I) como genoma parental. La relativa facilidad para aplicar las técnicas de mutagénesis sobre esta cepa favoreció la puesta a punto de los métodos a emplear. Para tal fin, se transformó a la cepa de *S. aureus* 8325-4 con el plásmido pTV1*ts*, portador del transposón Tn917, mediante transducción con el fago phi-11. Para ello, se infectó con el fago phi-11 un cultivo de la cepa de *S. aureus* KSI1024 (portadora del pTV1*ts*). El lisado de phi-11 que se obtuvo con posterioridad transportó al plásmido. Luego, se transdujo la cepa de *S. aureus* RN4220 con el lisado obtenido previamente. La cepa RN4220 se emplea como intermediaria en la transferencia genética entre cepas de *S. aureus*. Finalmente, se realizó la transducción de la cepa 8325-4 con el lisado de phi-11 proveniente de la cepa RN4220. Este lisado lleva el pTV1*ts* modificado por metilación, por lo tanto puede ser ahora aceptado por cualquier cepa de *S. aureus*. De este modo se obtuvieron 134 transductantes Cm^R (marcador del plásmido) que fueron Em^R (marcador del transposón), a las que se denominó 8325-T. Asimismo, se confirmó la presencia del plásmido en la cepa 8325-4 por extracción y corrida electroforética del ADN plasmídico digerido con la endonucleasa *EcoRI*. Se observó una única banda de peso molecular de ~12 Kb correspondiente al pTV1*ts* linearizado.

Posteriormente y con el objeto de obtener una biblioteca de inserciones del Tn917 en el genoma de la cepa 8325-4 se realizaron cultivos a partir de una colonia transductante 8325-T en diferentes condiciones de incubación. Luego de establecidas las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de Em óptimas se determinó que el 96% de bacterias sufrieron al menos un evento de transposición (Em^R) y curaron el plásmido (Cm^S). Considerando que la frecuencia de transposición del Tn917 al cromosoma de la cepa de *S. aureus* 8325-4 fue de $3,9 \times 10^{-4}$ y que la frecuencia espontánea de resistencia a la Em fue menor a 5×10^{-8} , se determinó que el fenotipo observado en las bacterias Em^R Cm^S se debió a la transposición del Tn917. De esta manera, se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo la mutagénesis por transposición y el curado del plásmido vector en forma simultánea.

3.4.1.2 Crecimiento de la cepa de *S. aureus* 8325-4 en medio líquido

A fin de establecer el tiempo que tarda el cultivo en medio mínimo en duplicar su DO, definido como tiempo medio de generación o TMG, se investigó la cinética de crecimiento de la cepa 8325-4 en medio definido mínimo (MDM) (Apéndice I) a 37°C y 200 rpm. El crecimiento bacteriano se registró espectrofotométricamente. En las condiciones de cultivo arriba mencionadas se observó un TMG de 120 min. Sin embargo, cuando la cepa 8325-4 se cultivó en un medio nutritivo, como el caldo cerebro-corazón, el TMG fue de 30 min (Figura 8). Por otro lado, se estableció el número de duplicaciones que lleva a cabo la cepa 8325-4 en MDM. El índice de duplicación para 8325-4 en MDM fue 4,81 y en caldo cerebro-corazón fue 4,08. Por lo tanto, la cepa 8325-4 en medio definido mínimo tuvo un moderado retardo en el crecimiento con respecto al observado en medio nutritivo.

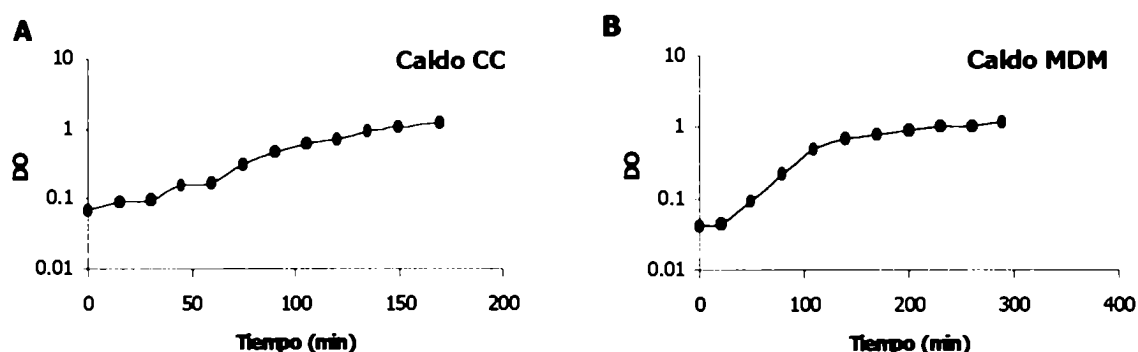


Figura 8: Cinética de crecimiento de la cepa de *S. aureus* 8325-4. La cepa 8325-4 se cultivó a 37°C y 200 rpm de agitación en distintos medios líquidos. **(A)** cerebro-corazón (CC). **(B)** medio definido mínimo (MDM). Cada punto representa la densidad óptica (DO) del cultivo medida a 600 nm.

3.4.1.3 Transformación de la cepa de *S. aureus* RN6390

En ensayos preliminares se comprobó que la inoculación ip con dosis altas de la cepa de *S. aureus* 8325-4 no provocó la muerte de la mayoría de los animales infectados. Por lo tanto, la imposibilidad de contar con un modelo murino de infección letal por la inoculación sistémica de la cepa 8325-4 fue la razón por la cual ésta cepa no

se consideró apropiada para ser utilizada como genoma parental de posibles mutantes atenuadas que deriven de ella. Entonces y con el objeto de aislar mutantes auxótrofas atenuadas se decidió utilizar como genoma parental la cepa RN6390 de *S. aureus* (Tabla 1). La cepa de *S. aureus* RN6390 mantiene su patrón hemolítico (expresa las α , β , γ y δ hemolisin) por lo que se la considera fuertemente virulenta respecto de su progenitora 8325-4 (144). Inicialmente, se transformó a la cepa de *S. aureus* RN6390 con el plásmido pTV1ts por transducción con el fago phi-11 siguiendo el esquema descrito en la sección 3.4.1.1. En total, se obtuvieron 77 transductantes Cm^R Em^R que se los denominó RN6390-T. Asimismo, se analizó la presencia del pTV1ts por extracción y corrida electroforética del ADN plasmídico digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. De esta manera, se transformó la cepa RN6390 con el plásmido pTV1ts para su posterior mutagénesis.

3.4.1.4 Crecimiento de la cepa de *S. aureus* RN6390 en medio líquido

Con el objeto de investigar la cinética de crecimiento de la cepa RN6390 en medio mínimo se realizó a partir de una colonia un cultivo en MDM a 37°C y 200 rpm de agitación. A distintos tiempos se monitoreó espectrofotométricamente el crecimiento bacteriano. En caldo MDM se estableció un TMG igual a 60 min. Sin embargo, en caldo cerebro-corazón (CC) el TMG fue de 40 min (Figura 9). En las condiciones de cultivo arriba mencionadas se determinó para RN6390 un índice de duplicación de 3,28 en caldo MDM y de 4,97 en caldo CC. Por lo tanto, el crecimiento de RN6390 en medio mínimo fue ligeramente más lento que en medio nutritivo.

3.4.1.5 Biblioteca de inserciones al azar de Tn917 en RN6390

Luego de analizar los resultados obtenidos en los ensayos preliminares con la cepa 8325-4, se realizó la mutagénesis de la cepa RN6390 por transposición del Tn917 siguiendo el diseño experimental óptimo establecido previamente. Por lo tanto, se realizó un cultivo a partir de una única colonia de RN6390-T en caldo CC suplementado con Cm. Luego de la incubación a 42°C se precipitaron por centrifugación las bacterias que curaron el plásmido pTV1ts. Se tomó una alícuota del pellet bacteriano a fin de

evaluar el fenotipo. Se observó que el 95% de las colonias presentaron el fenotipo Em^R Cm^S, por lo que se estableció que sufrieron al menos un evento de transposición y que curaron el plásmido. El pellet bacteriano se suspendió en caldo CC con 20 % de glicerol y se prepararon alícuotas en varios tubos para su conservación a -70°C. Cada vial contenía así una combinación de inserciones al azar de Tn₉₁₇ en RN6390. En resumen, se obtuvo una biblioteca de inserciones del transposón en la cepa virulenta RN6390 de *S. aureus*.

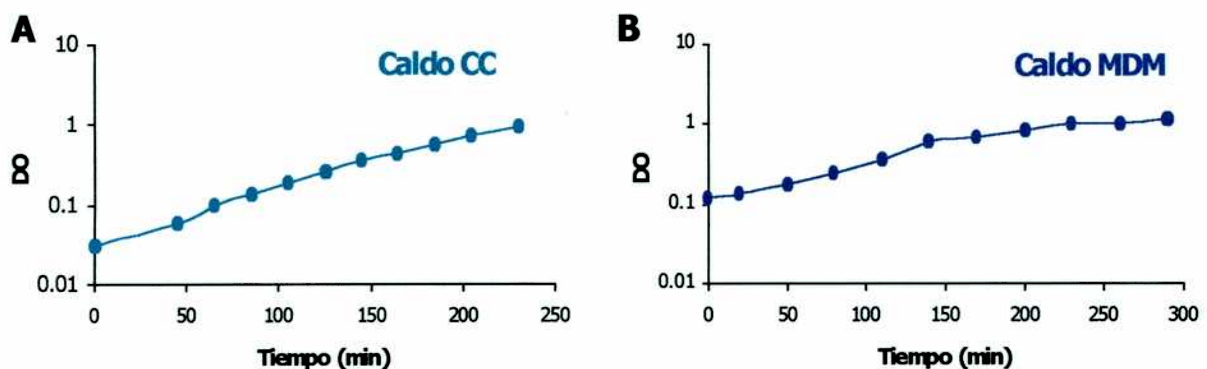


Figura 9: Cinética de crecimiento de la cepa de *S. aureus* RN6390. La cepa RN6390 se cultivó a 37°C y 200 rpm de agitación en distintos medios líquidos. **(A)** cerebro-corazón (CC). **(B)** medio definido mínimo (MDM). Cada punto representa la densidad óptica (DO) del cultivo medida a 600 nm.

3.4.2 Aislamiento e identificación de mutantes auxótrofos de RN6390

Luego de la mutagénesis y con el fin de aislar e identificar mutantes dependientes para su crecimiento de los aminoácidos aromáticos (Aro) se sembraron 3493 colonias Em^R Cm^S de RN6390 en una única estría en placas replicadas de agar MDM (placa #1) y en placas control positivo (Tabla 8). Transcurridas 20 h de incubación a 37°C se observó si existía desarrollo bacteriano. Se registraron 328 colonias con aparente fenotipo Aro. Estas colonias, que no crecieron en la placa #1 pero sí en la placa control, se sembraron de igual modo en el conjunto de placas II (Tabla 8). También se repicaron en placas de agar CC suplementadas con Em o Cm. Todas las colonias fueron Em^R y Cm^S, por lo tanto, sufrieron al menos un evento de

transposición y curaron el plásmido pTV1ts. Sin embargo, en sólo 10 colonias se observó un fuerte fenotipo dependiente de algún/os de los aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, mediante este esquema de identificación se aislaron 10 colonias auxótrofas para aminoácidos aromáticos (Aro⁻) y con fenotipo Em^R Cm^S.

Tabla 8: Placas de MDM suplementadas con diferentes aminoácidos y precursores

Conjunto	Nombre placa	MDM suplementado con:					
		Trp	Phe	Tyr	PABA	DHB	Ác nicotínico
<i>I</i>	#1	-	-	-	+	+	+
<i>II</i>	#2	-	+	+	+	+	+
	#3	+	+	-	+	+	+
	#4	+	-	+	+	+	+
	#5	-	+	-	+	+	+
<i>III</i>	#6	-	-	+	+	+	+
	#7	+	-	-	+	+	+
	#8	-	+	+	-	-	+
<i>IV</i>	#9	+	+	-	-	-	+
	#10	+	-	+			+
	#11	-	+	-			+
	#12	-	-	+			+
	#13	+		-			+
<i>V</i>	#14	-			-		+
	#15	-	-	-	-	-	-
Control positivo		+	+	+	+	+	+

+: contiene; -: no contiene; Trp: triptofano; Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina; PABA: ácido *p*-aminobenzóico; DHB: ácido 2,3-dehidrobenzóico.

3.4.3 Conclusiones parciales

Con la cepa de *S. aureus* 8325-4 se pusieron a punto las condiciones óptimas de mutagénesis por transposición del Tn917. Sin embargo, la cepa 8325-4 no pudo ser utilizada como genoma parental para la obtención de mutantes auxótrofas debido a que no pudo establecerse un modelo murino de infección letal. Por lo tanto, se decidió utilizar a la cepa de *S. aureus* RN6390 como genoma parental ya que se la considera fuertemente virulenta (144). Luego de la obtención de una biblioteca de inserciones del transposón Tn917 en la cepa RN6390 se analizó el crecimiento de 3493 colonias Em^R en placas de medio definido mínimo (MDM) carentes de Trp, Phe y Tyr. Se aislaron 328

colonias con aparente fenotipo Aro cuyo crecimiento se evaluó en diferentes placas de MDM (Tabla 8). Luego, se determinó que sólo 10 colonias presentaron un fuerte fenotipo dependiente para su crecimiento de el/los aminoácidos aromáticos. Estas mutantes aisladas merecieron una posterior caracterización.

OBJETIVO 5

Caracterización del fenotipo auxótrofo de las mutantes de *S. aureus* aisladas

3.5.1 Crecimiento de las mutantes auxótrofas en medio definido mínimo

Con el objeto de caracterizar el fenotipo auxótrofo (Aro⁻) de las 10 mutantes aisladas estas se sembraron en varias estrías en los conjuntos de placas *II* (Figura 10) y *III* (Figura 11) de MDM (Tabla 8). Transcurridas 20 h de incubación a 37°C se evaluó el desarrollo bacteriano. Las bacterias que presentaron deficiente o no crecimiento en alguna/s de la/s diferentes placas de agar MDM se registraron como mutantes dependientes para su crecimiento del aminoácido/s ausente/s en el medio.

En la tabla 9 se muestran los resultados de crecimiento de las distintas mutantes aisladas en los conjuntos de placas *II* y *III* (Tabla 8). En total, se aislaron 6 mutantes dependientes del aminoácido fenilalanina (Phe⁻). Sin embargo, sólo en la mutante *Sa129* se observó un marcado fenotipo Phe⁻. Asimismo, en las mutantes *Sa68* y *Sa306* se registró un acentuado fenotipo Tyr⁻ Phe⁻ y Tyr⁻ Phe⁻ Trp⁻, respectivamente. La mutante *Sa306* mereció un estudio mayor debido a la fuerte dependencia para su crecimiento de los tres aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, se procedió a la caracterización fenotípica de la enzima de la ruta biosintética posiblemente afectada. Para ello, se tuvieron en cuenta los estudios realizados al respecto en *Bacillus subtilis* (20). Considerando los resultados mencionados arriba, la mutante *Sa306* y la cepa parental RN6390 se sembraron en varias estrías en los conjuntos de placas *IV* y *V*. Luego de la incubación a 37°C durante 20 h se evaluó el desarrollo bacteriano. La ausencia total de crecimiento de la mutante *Sa306* en la placa #14 sugiere que la

enzima afectada y responsable del fenotipo observado sería alguna de las que intervienen en los primeros pasos de la vía metabólica (en la formación del ácido shiquímico y/o ácido corísmico) (Apéndice II); y no sería ninguna de las enzimas que a partir del ácido corísmico llevan a la formación de cada uno de los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp) (Apéndice II). Cabe mencionar que se observó el crecimiento de la cepa parental RN6390 en la placa #14. Por otro lado, no se observó crecimiento de la mutante *Sa306* ni de la cepa RN6390 en la placa #15, por lo tanto el ácido nicotínico sería un componente esencial para el crecimiento de la cepa RN6390 y sus derivadas. En el resto de las placas se observó algo de crecimiento de la mutante *Sa306*.

Tabla 9: Crecimiento de las mutantes auxótrofas en distintas placas de agar MDM

Colonia mutante	Crecimiento en:						Fenotipo
	conjunto de placas <i>II</i>			conjunto de placas <i>III</i>			
	#2	#3	#4	#5	#6	#7	
<i>Sa50</i>	+	+	+/-	NR	NR	NR	Phe ⁻
<i>Sa68</i>	+		+/-		-/+		Tyr ⁻ Phe ⁻
<i>Sa81</i>	+	+		+	-/+	-/+	Phe ⁻
<i>Sa85</i>	+	+		+	+/-		Tyr ⁻ Phe ⁻
<i>Sa129</i>	+	+		+/-			Phe ⁻
<i>Sa303</i>	+		+/-	+	+/-	-/+	Tyr ⁻ Phe ⁻
<i>Sa306</i>	-/+						Tyr ⁻ Phe ⁻ Trp ⁻
<i>Sa314</i>	+	+	+/-	NR	NR	NR	Phe ⁻
<i>Sa317</i>	+	+/-	+/-	+	-/+	-/+	Phe ⁻
<i>Sa326</i>	+	+	+/-	+	-/+	-/+	Phe ⁻

+: crecimiento; -: ausencia de crecimiento; -/+ : crecimiento en el origen de siembra, +/-: crecimiento en un cuarto de placa; NR: no realizado.

Por lo tanto, el fenotipo dependiente de los aminoácidos aromáticos para el crecimiento que presentó la mutante *Sa306* se debería a un defecto en alguno de los genes *aro* y tendría fenotipo Aro deficiente (Aro⁻). A fin de establecer si el fenotipo Aro

deficiente de la mutante *Sa306* se debió a la inserción genómica del transposón *Tn917* se evaluó la cotransducción del gen marcador del *Tn917* (Em^R) y de la auxotrofia Aro^- . Para ello, se preparó un lisado del fago phi-11 a partir de un cultivo de la mutante *Sa306*. El lisado así obtenido se utilizó para infectar un cultivo de la cepa parental RN6390. Luego se tomaron alícuotas para sembrar las diluciones apropiadas. El 100% de las colonias transductantes fueron Em^R y Aro^- . Por lo tanto, la Aro^- deficiencia se debería a una modificación del gen afectado por la inserción del transposón.

3.5.2 Crecimiento de la mutante *Sa306* en medio líquido

Con el objeto de comparar la cinética de crecimiento de la mutante *Sa306* con respecto a la cepa parental RN6390, se realizaron cultivos en medio líquido en presencia o ausencia de Em a $37^\circ C$ y 200 rpm de agitación. En caldo MDM, el tiempo que tardó la mutante *Sa306* en duplicar su DO (TMG=60 min) fue similar al observado para la cepa RN6390 (sección 3.4.1.4) Cuando se agregó el antibiótico Em al medio mínimo, el TMG de la mutante *Sa306* aumentó a 90 min. (Figura 12).

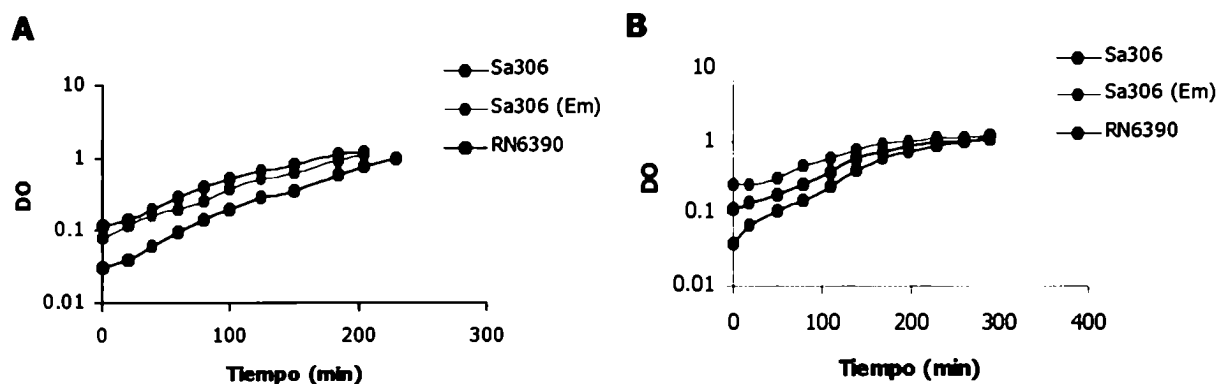


Figura 12: Cinética de crecimiento de la mutante y la cepa parental. **(A)** Caldo cerebro-corazón. **(B)** Caldo de medio definido mínimo (MDM). (Em): cultivo suplementado con $10 \mu g/ml$ de eritromicina. En todos los casos, los cultivos se incubaron a $37^\circ C$ y 200 rpm de agitación. Cada punto representa la densidad óptica (DO) del cultivo medida a 600 nm .

Por otro lado, el índice de duplicación de *Sa306* en MDM se determinó igual a 4,68; siendo de 2,25 cuando se agregó Em a ese medio. En caldo CC, el TMG de *Sa306*

se estableció igual a 40 min, siendo similar al valor hallado en las mismas condiciones para RN6390 (sección 3.4.1.4). En este caso el índice de duplicación de la mutante fue 3,31. Sin embargo, cuando se agregó Em al medio el TMG de *Sa306* aumentó a 50 min y el índice de duplicación fue de 3,77. Por lo tanto, la presión de selección ejercida por la presencia del antibiótico Em en el medio ocasionó un leve retardo en el crecimiento de la mutante *Sa306*. Sin embargo, la mutante *Sa306* al igual que la cepa parental, mostraron el mismo tiempo medio de generación en los caldos MDM o CC carentes de Em. Por lo tanto, no existieron diferencias en la velocidad de crecimiento *in vitro* entre la mutante *Sa306* y la cepa parental RN6390.

3.5.3 Crecimiento de la mutante *Sa306* en medio sólido

A fin de estudiar la reversión del fenotipo Aro deficiente de la mutante *Sa306* se suspendieron 5 colonias aisladas en 1 ml de solución fisiológica estéril. Luego, se sembró por duplicado 200 μ l de la suspensión bacteriana en placas de MDM #14 y en placas de agar cerebro-corazón (CC) suplementada o no con Em (10 μ g/ml), como controles. También se tomó una alícuota para realizar diluciones seriadas a fin de obtener el recuento cuantitativo de las UFC presentes en la suspensión. Transcurridas 20 h de incubación a 37°C, no se observaron revertantes de la mutante *Sa306*, pero si desarrolló un césped bacteriano (bacterias viables) en las placas control. Teniendo en cuenta el recuento observado, se estimó que la frecuencia de reversión de la mutante *Sa306* fue menor a 5×10^{-13} . El experimento se realizó por triplicado y la frecuencia de reversión hallada corresponde al promedio de las UFC/ml.

Por otro lado, se investigó el crecimiento de la mutante *Sa306* en distintas placas de MDM durante un período largo de incubación. Para ello, ocho colonias aisladas de *Sa306* se sembraron independientemente en los conjuntos de placas de MDM II, III, IV y V (sólo placa #14). El crecimiento bacteriano se observó transcurridas 20 h y 7 d de incubación a 37°C. Los resultados obtenidos a las 20 h mostraron ausencia total de crecimiento de la mutante *Sa306* en las placas ensayadas. Sin embargo, al cabo de 7 d de incubación, la mutante *Sa306* creció ligeramente en la mayoría de las placas de agar

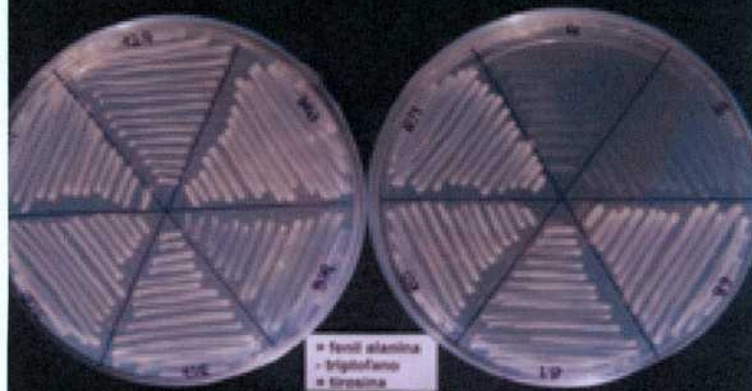
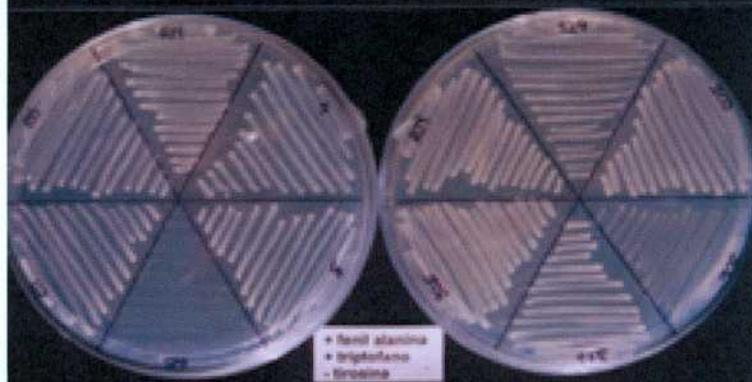
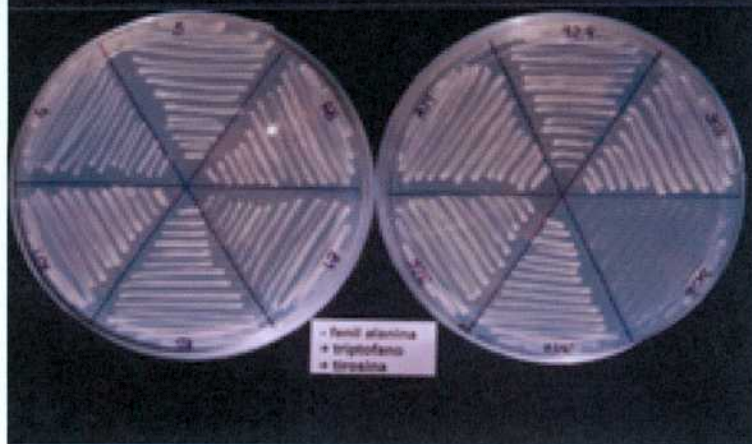
A**B****C**

Figura 10: Crecimiento de las mutantes auxótrofas en distintas placas de agar medio definido mínimo (MDM). **A:** placa #2 (sin Trp); **B:** placa #3 (sin Tyr); **C:** placa #4 (sin Phe). Las fotografías fueron tomadas al 5° día de la siembra bacteriana. Las colonias se sembraron en placas replicadas. Trp: triptofano; Tyr: tirosina; Phe: fenilalanina.

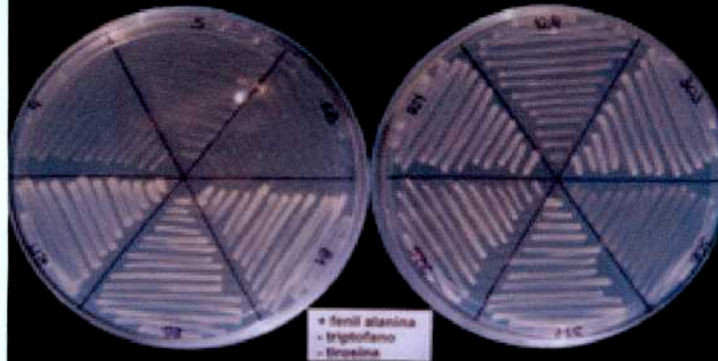
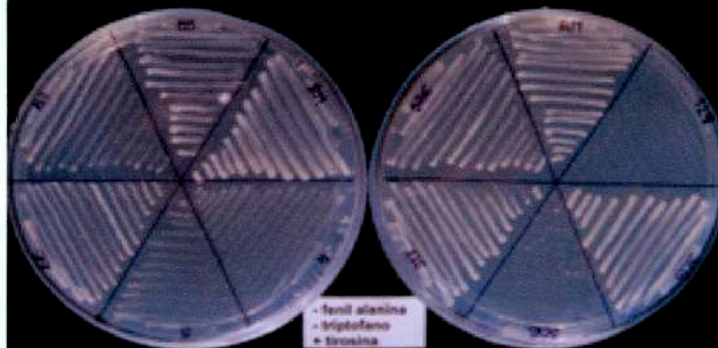
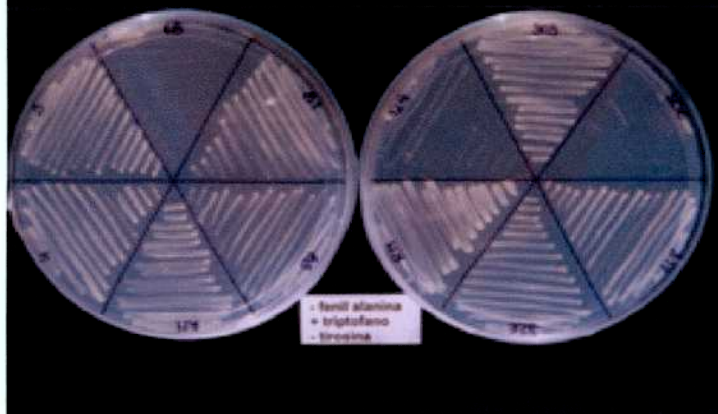
A**B****C**

Figura 11: Crecimiento de las mutantes auxótrofas en distintas placas de agar medio definido mínimo (MDM). **A:** placa #5 de MDM (sin Trp, sin Tyr); **B:** placa #6 de MDM (sin Trp, sin Phe); **C:** placa #7 de MDM (sin Phe, sin Tyr). Las fotografías fueron tomadas al 5º día de la siembra bacteriana. Las colonias se sembraron en placas replicadas. Trp: triptofano, Tyr: tirosina, Phe: fenilalanina.

MDM pero no así en la denominada placa #14. Por lo tanto, a tiempos largos de incubación, el fenotipo Aro⁻ de la mutante *Sa306* se mantuvo *in vitro*. Debido a que la escisión del transposón Tn917 es extremadamente rara (180, 228) y en vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el fenotipo de la mutante *Sa306* Aro⁻ no revertiría fácilmente al fenotipo salvaje.

3.5.4 Estabilidad de la mutante *Sa306*

Con el objeto de establecer la estabilidad del fenotipo Aro deficiente de la mutante *Sa306* se evaluó el crecimiento *in vitro* en medio mínimo luego de varios pasajes en medio nutritivo. Para ello, se realizaron repiques sucesivos (n=25) de una colonia aislada de *Sa306* en placas de agar CC suplementadas con Em. El repique número 26 se sembró en diferentes placas de agar MDM (conjuntos II, III, IV y V). Transcurridas las 20 h de incubación, no se observó desarrollo bacteriano en las placas #3 a #14. Sólo en la placa #2 (sin Trp) se registró un ligero crecimiento de *Sa306* en la zona inicial de siembra. Se puede concluir que el fenotipo Aro⁻ de la mutante *Sa306* fue estable *in vitro* al cabo de 25 repiques y por lo tanto podría deberse a un cambio genético y no a una adaptación fisiológica.

Asimismo, la estabilidad del fenotipo Aro⁻ de la mutante *Sa306* se evaluó *in vivo*. Para ello, ratones normales se inocularon con la mutante *Sa306* (1×10^5 UFC/ratón) por vía iv. A las 3 horas, los animales se sacrificaron, se extirparon los bazo y se realizaron los homogenatos en agua destilada estéril. Alícuotas de la dilución apropiada de las suspensiones homogeneizadas se sembraron en placas de agar CC suplementadas con Em. Luego, de cada placa se repicaron 100 colonias Em^R en placas #14 de MDM y placas control. El 100% de las colonias de *Sa306* recuperadas mantuvieron el fenotipo Aro⁻ luego del pasaje *in vivo*. Por lo tanto, se puede especular que el pasaje de la mutante por el huésped no afectaría el fenotipo observado en *Sa306* y por lo tanto la Aro deficiencia no correspondería a una adaptación fisiológica.

3.5.5 Conclusiones parciales

Luego del análisis inicial en busca de mutantes auxótrofos, se aislaron 10 mutantes de RN6390 con fenotipo Aro deficiente. La mutante *Sa306* mostró un fuerte fenotipo Tyr⁻ Phe⁻ Trp⁻ y por lo tanto, se seleccionó para su posterior caracterización. La evaluación del crecimiento de *Sa306* en la placa #14 de MDM (Tabla 8), permitiría sugerir que la enzima afectada y responsable del fenotipo Aro⁻ sería alguna de las que intervienen en los pasos que dan lugar a la formación del ácido shikímico y/o ácido corísmico (Apéndice II). Por otro lado, la resistencia a la Em y el fenotipo Aro⁻ de la mutante *Sa306* cotransdujeron en un 100% a la cepa parental RN6390. La comparación de la cinética de crecimiento estableció que no existieron diferencias en la velocidad de crecimiento *in vitro* entre de la mutante *Sa306* y de la cepa parental RN6390. La frecuencia de reversión de la mutante *Sa306* fue 5×10^{-13} . Además, el fenotipo Aro deficiente de la mutante *Sa306* demostró ser estable *in vitro* al cabo de 25 repiques e *in vivo* luego de la inoculación y recuperación bacteriana. Considerando los resultados hallados se puede especular que el fenotipo Aro⁻ de la mutante *Sa306* debería a un cambio genético producto de la inserción del transposón y no a una adaptación fisiológica.

OBJETIVO 6

Caracterización molecular de las mutantes auxótrofos de *S. aureus* aisladas

3.6.1 Análisis de las mutantes auxótrofos por hibridación genómica

En primera instancia, se estableció si el fenotipo auxótrofo de las mutantes aisladas se debió a una única inserción del transposón en el genoma bacteriano. Por lo tanto, el ADN cromosomal de las mutantes halladas se analizó por hibridación usando como sonda un fragmento interno del Tn917. Para ello, el genoma de las mutantes se digirió con la enzima de restricción *EcoRI*. La elección de la enzima se debió al hecho de que el transposón Tn917 no posee sitios internos de corte para *EcoRI*. Los fragmentos de digestión del ADN genómico de las mutantes se separaron por

electroforesis y se transfirieron a una membrana de nylon. Posteriormente, la membrana se hibridó con la sonda marcada con digoxigenina (fragmento de 1,8 Kb obtenido por digestión del Tn917 con la enzima *Bgl*II). Mediante el análisis de la hibridación genómica se comprobó que todas las mutantes analizadas presentaron una única inserción del Tn917 debido a que un único fragmento hibridó con la sonda específica. Asimismo, se verificó que la inserción del Tn917 ocurrió al azar en el cromosoma debido a la variación en el tamaño (entre 9,4 y 4,3 Kb) de los fragmentos (Figura 13).

3.6.2 Caracterización del sitio de inserción de Tn917 en la mutante Sa306

Con el objeto de determinar, sin posibilidad de error, el gen afectado por la transposición del Tn917 se analizó el sitio de inserción a fin de diseñar la estrategia para obtener un fragmento representativo para su posterior secuenciación. La caracterización del sitio de inserción del Tn917 en el cromosoma de la mutante Sa306 se analizó por hibridación genómica con la sonda específica para el transposón. Para ello, el ADN genómico de la mutante se digirió con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI. Se eligieron estas enzimas de restricción porque la región correspondiente al transposón Tn917 posee dos o ningún sitio de corte, respectivamente. Los fragmentos del ADN cromosomal de Sa306 se separaron por electroforesis, se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con la sonda marcada. La digestión genómica con *Eco*RI provocó un único fragmento de 6,2 Kb, constituido por el Tn917 (5,6 Kb) intacto y aproximadamente 600 pb del cromosoma de la mutante. Por medio de la digestión con *Hind*III se originaron tres fragmentos. El fragmento esperado de tamaño constante (1,3 Kb) correspondiente a la región interna del Tn917 y los otros dos (3 y 1,8 Kb) correspondientes a los extremos flanqueantes izquierdo y derecho que contienen parte del transposón y parte del ADN cromosomal (Figura 14).

En vista de los resultados obtenidos se prosiguió el estudio con el fragmento derecho de unión (Figura 14) producto de la digestión del genoma de la mutante Sa306 con la enzima *Hind*III. Posteriormente, el ADN cromosomal de la mutante se digirió con *Hind*III y se procedió a la auto-ligación de la región genómica flanqueante al

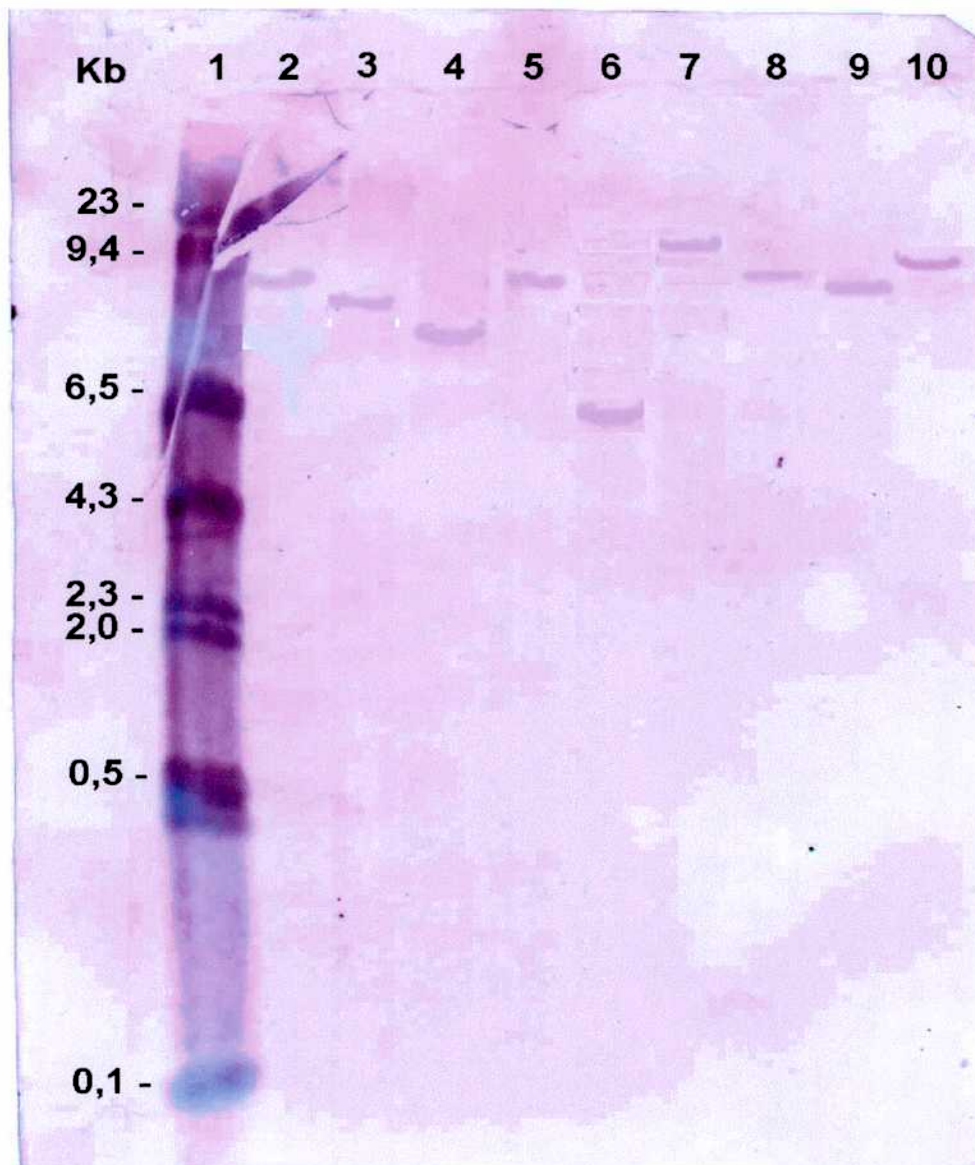


Figura 13: Hibridación genómica de las mutantes auxótrofas. ADN cromosomal digerido con *EcoRI* correspondiente a la mutante *Sa326* (calle 2), *Sa317* (calle 3), *Sa129* (calle 4), *Sa85* (calle 5), *Sa306* (calle 6), *Sa81* (calle 7), *Sa68* (calle 8), *Sa5* (calle 9) y *Sa4* (calle 10). El ADN del fago Lambda digerido con *HindIII* se utilizó como marcador de peso molecular (calle 1). Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8% y se transfirieron a una membrana de nylon. Estos se hibridaron con la sonda marcada con digoxigenina correspondiente al fragmento de *Tn917* obtenido por digestión con *BglI*.

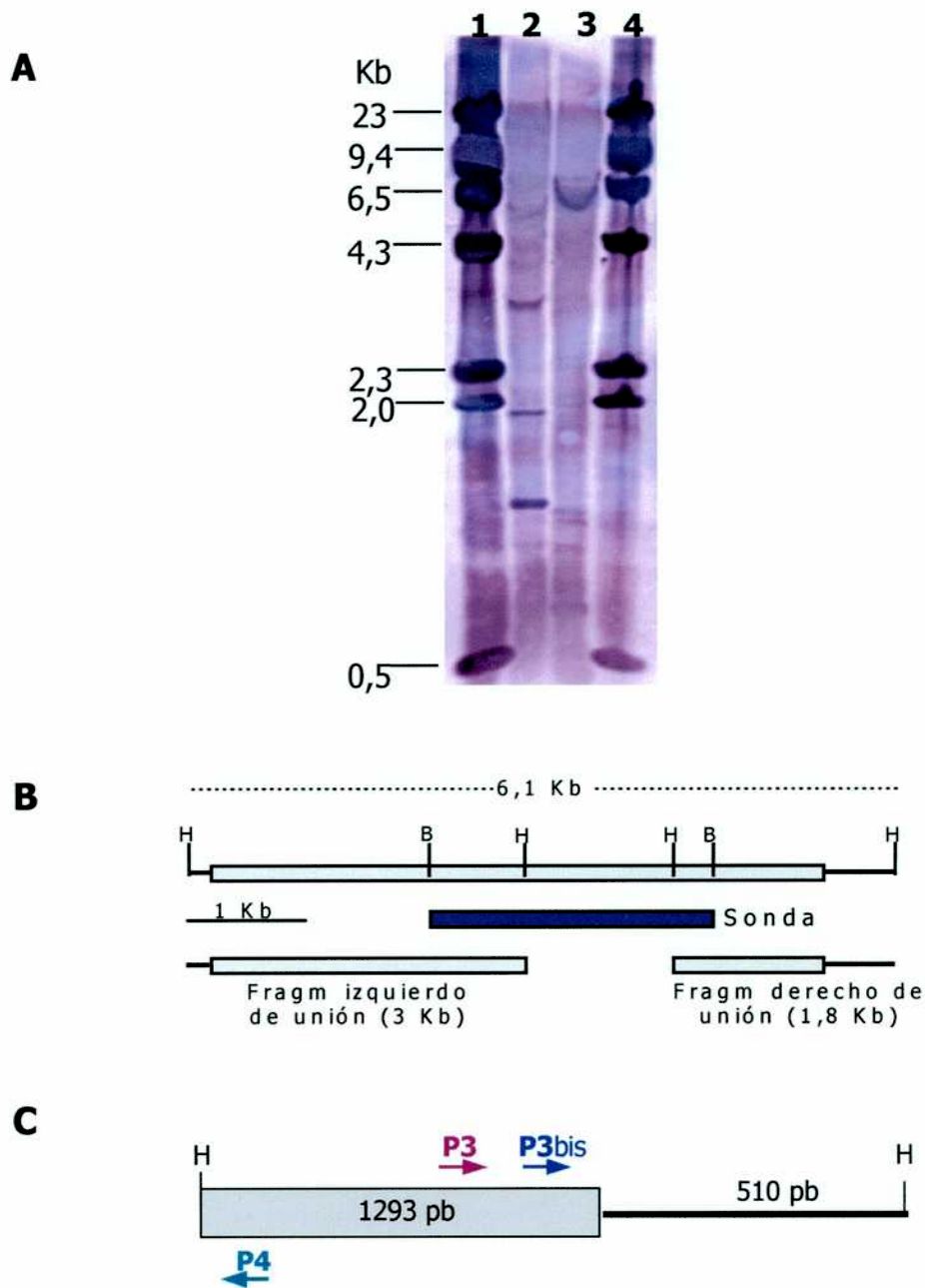


Figura 14. Mapeo del sitio de inserción de Tn917 en Sa306. **(A)** Fragmentos de ADN genómico de Sa306 (calle 2: *Hind*III y calle 3: *Eco*RI) hibridados con sonda marcada específica (fragmento *Bgl*II de Tn917). Marcador de peso molecular: fago lambda digerido con *Hind*III (calles 1 y 4). **(B)** Representación esquemática de la inserción de Tn917 (rectángulo gris) en el fragmento cromosómico de Sa306 (líneas negras gruesas) obtenido por digestión con *Hind*III. Se muestran los sitios de restricción relevantes en Tn917. El rectángulo azul representa la sonda (fragmento *Bgl*II de Tn917). **(C)** Representación esquemática del fragmento derecho de unión y los cebadores P3, P3bis y P4. H: *Hind*III; B: *Bgl*II

transposón junto a una porción del Tn917 (fragmento derecho de unión). De este modo se creó el plásmido pHIND. Luego, se realizó una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) del modo inverso utilizando como templado al plásmido pHIND y los cebadores P3 y P4 (Figura 14). El producto de PCR que se obtuvo fue del tamaño esperado (~1 Kb). Debido al gran tamaño del fragmento amplificado se realizó otra PCR inversa utilizando un cebador externo a P3 (P3bis) y el cebador P4. De este modo se obtuvo un producto de PCR de un tamaño menor (~600 pb) ya que se disminuyó la longitud de la porción de ADN amplificado del Tn917 y por lo tanto, de secuencia conocida.

Con el objeto de confirmar la especificidad del producto amplificado con los cebadores P3bis y P4, se realizó la hibridación del producto de PCR (~600 pb) con la sonda específica para Tn917 (Figura 15). Mediante este análisis se determinó que el producto de PCR de ~600 pb hibridó con la sonda marcada de Tn917 (fragmento *Bgl*II de 1,8 Kb) y por lo tanto la secuencia conocida (control) fue amplificada demostrando la especificidad del fragmento analizado.



Figura 15: Amplificación e hibridación del fragmento derecho flanqueado por parte del transposón. **(A)** PCR del fragmento derecho de ADN genómico con *Hind*III que contiene una porción del Tn917. **(B)** Hibridación con sonda específica para Tn917 marcada con digoxigenina. Para ambos paneles: *calle 1*: bandas de 700 y 600 pb del marcador de peso molecular; *calles 2 y 3*: productos de PCR; *calle 4*: control negativo y *calle 5*: control positivo.

3.6.3 Secuenciación del sitio de inserción

Posteriormente, se procedió al análisis de la secuencia nucleotídica obtenida como resultado de la secuenciación automática del fragmento de PCR amplificado con los cebadores P3bis y P4. A partir de la secuencia nucleotídica hallada (313 pb) (Figura 16) se dedujo la porción de ADN incógnita (253 pb) mediante la localización de la secuencia correspondiente al transposón y al sitio de restricción *Hind*III. Posteriormente, las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas se compararon con los bancos de datos del GenBank y EMBL utilizando los programas BlastN, BlastP y SwissProt. Mediante la comparación a nivel de ADN se estableció que la secuencia nucleotídica incógnita (253 pb) presentó un 94% de identidad con el gen *aroA* de *S. aureus* (número de acceso: L05004) (147) siendo este valor significativo ($p=9.e^{-117}$). A nivel aminoacídico, se determinó que la secuencia incógnita (84 aa) exhibió un 79% de homología significativa ($p=4.e^{-18}$) con la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (*aroA*) de *S. aureus* (EC: 2.5.1.19).

Asimismo, la comparación de la secuencia nucleotídica incógnita con las bases de datos (The Sanger Centre, University of Oklahoma y The Institute for Genome Research) del genoma no finalizado de *S. aureus* estableció porcentajes de homología significativos con secuencias "contig". A fin de determinar la correspondencia génica de las secuencias "contig", dado que esta información es desconocida para el público, se comparó la secuencia del gen *aroA* (número de acceso: L05004) con los bancos de datos del genoma no finalizado de *S. aureus*. Esta estrategia reveló que el gen *aroA* de *S. aureus* presentó homología significativa con la misma secuencia "contig" que la secuencia incógnita. Por lo tanto, a pesar de desconocer la correspondencia génica de tales secuencias "contig", por medio de este análisis se confirmaría que la secuencia incógnita correspondería a parte del gen *aroA* de *S. aureus*.

Además, se comparó la secuencia nucleotídica incógnita con el gen de la EPSPS de *Bacillus subtilis* (número de acceso: Z99115) (72) estableciéndose un 49% de homología. Asimismo, se realizó el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los genes *aroA* de *S. aureus* y de *B. subtilis* con la secuencia incógnita (Figura 17).

- A** ATTAAAGATGCCGAGGAATTTAAAAGTAAAAGAAAANAATAGAAATTNATAACAACGGCTGAT
 ATGTTAAACTTGTTAGGGTTTGAATTANAACCAACTAATGATGGATTNATTATTNATNCG
 TCAGAATTTAAAACAATGCAACNGATATTTTAACTNATCATCGAATNGGAANGATGNTT
 GCAGTTGCTTGNGTANTTTCAAGNGAGCCTGTCAAATCAAACAATTTGATNCTGTAAAT
 GTATCATTTCCAGGATTTTACCAAAATAAAGCTTCGAAGGACAACGTCTGAAAACCCC
 ACTTCCTTTTTGGTGACGAAGTCTGCCTTA HindIII
- B** LKVKE?NRI?TTADMLNLLGFEL?PTNDG?II??SEFKTNA?DILT?HR?G?M?AVA?V?
 S?EPVKIKQFD?VNVSFPGFLPKLKL

Figura 16: Secuencia flanqueante al sitio de inserción del Tn917 en la mutante Sa306.
(A) Secuencia nucleotídica (259 pb). Las letras azules corresponden a parte de la porción del Tn917 amplificada con el cebador P4. El sitio de restricción *HindIII* se encuentra subrayado. El resto de la secuencia corresponde a ADN incógnita. **(B)** Secuencia aminoacídica (84 aa). Los aminoácidos se designaron con una única letra.

Por lo tanto, el transposón Tn917 se encontraría insertado en el gen *aroA* que codifica para la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa de *S. aureus*. Ciertamente, debido a que no se llegó a secuenciar el extremo 3' final del transposón Tn917 no fue posible determinar con exactitud el sitio de inserción del transposón en el gen *aroA*. Sin embargo, analizando los tamaños esperados de la amplificación con los cebadores P4 y P3bis y considerando el mapeo de inserción (Figura 14-A) se podría especular que el Tn917 podría estar insertado entre los nucleótidos 830-850 del gen *aroA* (1284 pb) de *S. aureus* (147).

Ciertamente, mediante la secuenciación se confirmó la observación presuntiva previa correspondiente al fenotipo de la mutante Sa306. La enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa participa en el sexto paso de la biosíntesis del ácido corísmico dentro de la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. Esta enzima convierte el ácido shiquímico-3-fosfórico en ácido 5-enolpiruvil-shiquímico-3-fosfórico por medio de la interacción con el fosfoenolpiruvato (Apéndice II).

Saureus	1	MVNEQIIDISGPLKGEIEVPGDKSMTHRAIMLASLAEGVSTIYKPLLGEDCRRMTDIFRH
Sa306	1	-----
Bsubti	1	----MKRDKVQTLHGEIHIPGDKSISHRSVMFGALAGTTTVKNFLPGADCLSTIDCFRK
Saureus	61	LGVEIKEDDEKLVVTSPGYQVN-TPHQVLYTGNSGTTTRLLAGLLSGLGNESVLSGDVSI
Sa306	1	-----
Bsubti	57	MGVHIEQSSDVVIHGKGIDALKEPESLLDVGNSGTTIRLMLGILAGRPFYSAVAGDESI
Saureus	120	GKRPMDRVLRPLKLM DANIEG-IEDNYTPLIIKPSVIKGINYQMEVASAQVKSAILFASL
Sa306	1	-----
Bsubti	117	AKRPMKRVTEPLKMGAKIDGRAGGEFTPLSVSGASLKGIDYVSPVASAQIKSAVLLAGL
Saureus	179	FSKEPTIIKELDVSRNHETMFKHFNIPIEAEGLSINTTPEAIRYIKPADFHVPGDISSA
Sa306	1	-----
Bsubti	177	QAEGTTTVTEPHKSRDHTERMLSAFGVKLSED--QTSVSIAGGQKLTAADIFVPGDISSA
Saureus	239	AFFIVAALITPGSDVTIHNVGINQTRSGIIDIVEKMGGNIQLFNQTTGAEPTASIRIQYT
Sa306	1	-----
Bsubti	235	AFFLAGAMVPNSRIVLKNVGLNPTRTGIIDVLQNMGALEIKPSADSGAEPYGDLIET
Saureus	299	PMLQPTTIEGELVPKAIDELPVIALLCQAVGTSTIKDAEELKVKETNRIDTTADMLNLL
Sa306	1	-----LKVKENR--ITTADMLNLL
Bsubti	295	SSLKAVEIGDIIPLRIDEIPIIALLATQAEGTTVIKDAEELKVKETNRIDTVVSELRKL
Saureus	359	GFELQPTNDGLI IH-PSEFKTNATDILTDRH-IGMMLAVACVLSSEPVKIKQFDVNVSF
Sa306	18	GFELP-TNDGII S----EFKTNADILTHRG-----MAVAVSEPVKIKQFD-VNVSF
Bsubti	355	GAIEPTADGMKVYKQTLKGGAAVSSHGDHRIGMMLGIASCITEEPIEIEHTDAIHVSY
Saureus	417	PGFLPKLKLQNEG
Sa306	63	PGFLPKLKL-----
Bsubti	415	PTFFEHLNKLKSKS

Figura 17: Alineación de las secuencias aminoacídicas de las EPSPS (*aroA*) de *S. aureus*, *B. subtilis* y de la mutante *Sa306*. Los aminoácidos idénticos en las tres secuencias están indicados en rosado y las sustituciones conservativas de aminoácidos están señaladas en azul. Los espacios, indicados con guión, fueron introducidos para maximizar la homología. La alineación se realizó utilizando el programa ClustalW (versión 1.81). Bsubti: *Bacillus subtilis*, Saureus: *Staphylococcus aureus*, Sa306: secuencia incógnita correspondiente a la mutante *Sa306*. EPSPS: 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa.

3.6.4 Conclusiones parciales

Mediante la secuenciación de la región flanqueante derecha del transposón se estableció que la secuencia incógnita presentó un 94% de identidad nucleotídica con la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) de *S. aureus* y un 49% de homología con el gen de la EPSPS (denominado *aroE*) de *Bacillus subtilis*. Asimismo, la comparación de la secuencias aminoacídica reveló un 79% de homología con la enzima EPSPS de *S. aureus*. La comparación de la secuencia nucleotídica incógnita con las distintas bases de datos del genoma no finalizado de *S. aureus* determinó porcentajes de homología significativos con determinadas secuencias "contig" de cada banco de datos. Además, éstas fueron coincidentes con las secuencias "contig" resultantes de la comparación del gen *aroA* de *S. aureus* en las mismas bases de datos. Por lo tanto, a pesar de la falta de información publicada, se estableció que la secuencia incógnita tendría un significativo porcentaje de identidad con el gen *aroA* de *S. aureus*. La alineación de las secuencias aminoacídicas de los genes *aroA* de *S. aureus* y de *B. subtilis* con la secuencia incógnita reveló una alta homología entre ellas (Figura 17). Por lo tanto se podría sugerir que la inserción del transposón Tn917 en el gen *aroA* es responsable del fenotipo Aro deficiente observado en la mutante Sa306. Ciertamente, se aisló una mutante de *S. aureus aroA*, denominada Sa306, mediante mutagénesis insercional.

OBJETIVO 7

Determinación del grado de atenuación de la mutante auxótrofa de *S. aureus*

Posteriormente a la caracterización de la mutante Sa306 se evaluó el grado de atenuación a fin de establecer la inocuidad de la mutante *aroA* aislada. Existe evidencia de que algunas mutantes de *S. aureus* pueden presentar diferentes grados de atenuación según el modelo de infección en estudio (39). Por tal motivo, los experimentos *in vivo* se realizaron en dos modelos murinos de infección sistémica. En uno de ellos, la suspensión bacteriana se administró por vía ip. En el modelo de infección por diseminación hematógena de la bacteria, ésta se inoculó directamente en el torrente sanguíneo.

3.7.1 Modelo murino de letalidad por *S. aureus* administrado por vía ip

Inicialmente, se estableció la condición óptima de suspensión del inóculo bacteriano con el objeto de lograr una mortalidad alta en los grupos de animales inyectados con dosis no tóxicas de la cepa parental virulenta. Para ello, los ratones se inocularon por ruta ip con la cepa parental RN6390 suspendida en solución salina fisiológica (SF), mucina gástrica al 5% en SF (MG) o en extracto de levadura al 2% en caldo CC (LV). Se administraron diluciones seriadas al décimo entre 10^2 y 10^8 UFC por ratón. Los animales de los grupos control recibieron un inóculo de SF, MG o LV, respectivamente. Se observó la mortalidad de los animales y se calculó la DL_{50} para cada grupo (Tabla 10). No se observaron animales muertos en los grupos control. En vista de los resultados obtenidos, la cepa parental RN6390 fue altamente virulenta cuando se la inoculó en una suspensión de LV por vía ip.

Tabla 10: DL_{50} de la cepa RN6390 suspendida en distintos medios

RN6390	SF	MG 5%	LV 2%
DL_{50}	$4,8 \times 10^7$ UFC/ratón	$>7,4 \times 10^5$ UFC/ratón	$6,3 \times 10^4$ UFC/ratón
log DL_{50}	7,6	$>5,8$	4,7

3.7.1.1 Cálculo de la DL_{50} de la mutante *Sa306* por vía ip

Con el objeto de establecer el grado de atenuación de la mutante *Sa306* con respecto a la cepa parental virulenta RN6390 se determinó la DL_{50} . Para tal fin, las bacterias se suspendieron en una solución de extracto de levadura al 2% en caldo CC. Se estableció que la dosis de *Sa306* capaz de producir la muerte del 50% de los animales inoculados fue 16 veces superior a la DL_{50} de la cepa virulenta parental (DL_{50} de *Sa306* = 1×10^6 UFC/ratón y DL_{50} de RN6390 = $6,3 \times 10^4$ UFC/ratón). Por lo tanto, la mutante *Sa306* demostró tener un importante grado de atenuación respecto de la cepa parental.

3.7.1.2 Supervivencia de los animales inoculados por vía ip

A fin de establecer si la atenuación observada en la mutante *Sa306* era significativa con respecto a la cepa parental se analizó la supervivencia de los animales infectados con *Sa306* o RN6390 por vía ip. Dentro de las 72 h de producida la inoculación se produjo la muerte de algunos ratones. Sin embargo, los animales se observaron diariamente hasta el séptimo día post-infección, momento en el que los ratones mostraron una franca mejoría. Luego, los animales se sacrificaron. Cuando se administró la cepa parental RN6390 ($1-3 \times 10^5$ UFC/ratón) se observó al cabo de 72 h un 0% de supervivencia (vivos/muertos: 0/19) de los animales. Sin embargo, cuando los animales se inocularon con una dosis similar de la mutante *Sa306* se observó un 46% de animales supervivientes (vivos/muertos: 6/13), porcentaje que fue estadísticamente significativo cuando se lo comparó con los resultados observados con la cepa RN6390 ($p=0,009$; test exacto de Fisher). Por lo tanto, la mutante *Sa306* fue significativamente menos virulenta que la cepa parental RN6390 cuando se la inoculó suspendida en LV por ruta ip.

3.7.2 Modelo murino de infección por diseminación hematológica de las cepas de *S. aureus* administradas por vía iv

Con el objeto de establecer si la atenuación de la mutante *Sa306* era dependiente del modelo animal utilizado se realizó una serie de ensayos en otro modelo murino, esta vez de infección sistémica por diseminación hematológica de la bacteria. En un principio, se determinó la DL_{50} de la cepa parental RN6390 suspendida en SF o LV e inoculada por vía iv. Se administraron diluciones seriadas al décimo entre 10^2 y 10^7 UFC por ratón. La mortalidad de los animales se registró diariamente hasta el séptimo día. Los ratones del grupo control se inyectaron con SF o LV. No se observó mortalidad de los animales en éstos grupos. No se establecieron diferencias en la DL_{50} de la bacteria RN6390 suspendida en SF (DL_{50} : 4×10^7 UFC/ratón) o LV (DL_{50} : $>7,7 \times 10^6$ UFC/ratón). En vista de los resultados se decidió en los futuros experimentos administrar las bacterias por vía iv suspendidas en SF. Estos resultados demostraron que la DL_{50} de la cepa parental RN6390 inoculada por vía iv fue más alta que cuando se la administró por vía ip.

3.7.2.1 Cálculo de la DL₅₀ de la mutante *Sa306* por vía iv

A fin de determinar el grado de atenuación de la mutante *Sa306* en un modelo de infección sistémica por diseminación hematógena ésta se inoculó por vía iv suspendida en SF. Se estableció que la dosis de *Sa306* capaz de producir la muerte del 50% de los animales inoculados fue $1,3 \times 10^7$ UFC/ratón. Por lo tanto, en tales condiciones la DL₅₀ de la mutante *Sa306* no difirió de la determinada para la cepa parental RN6390. Por lo tanto, el grado de atenuación de *Sa306* determinado previamente (secciones 3.7.1.1 y 3.7.1.2) no se observó cuando la mutante se administró por otra vía de inoculación como la iv.

3.7.2.2 Supervivencia de los animales inoculados por vía iv

Con el objeto de evaluar los efectos de la inoculación por vía iv de la mutante *Sa306* o de la cepa parental RN6390 se analizó la supervivencia de los animales infectados durante un período de 31 d. Los ratones se observaron diariamente luego de producida la administración por vía iv (2×10^7 UFC/ratón) de la suspensión bacteriana. Al octavo día de la inoculación con la cepa parental RN6390 se observó un 17% de supervivencia (vivos/muertos: 2/10) de los animales. Por el contrario, a ese tiempo se observó una supervivencia del 57%, significativamente (vivos/muertos: 8/6) más alta en el grupo de animales inoculados con la mutante ($p=0,04$; test exacto de Fisher).

Asimismo, al cabo de 22 d se observó el 0% de supervivencia (vivos/muertos: 0/12) de los animales inoculados con RN6390. Sin embargo, cuando los animales se inocularon con la mutante *Sa306* se observó una supervivencia del 43% estadísticamente significativa (vivos/muertos: 6/8) ($p=0,01$; test exacto de Fisher). Luego de 22 d, no se observó la muerte de ningún animal inoculado con la mutante *Sa306*. En conclusión, la mutante *Sa306* demostró tener un significativo grado de atenuación respecto de la cepa parental RN6390 cuando se la inoculó por ruta iv suspendida en SF a pesar de que ambas cepas mostraron similares valores de DL₅₀ (Figura 18).

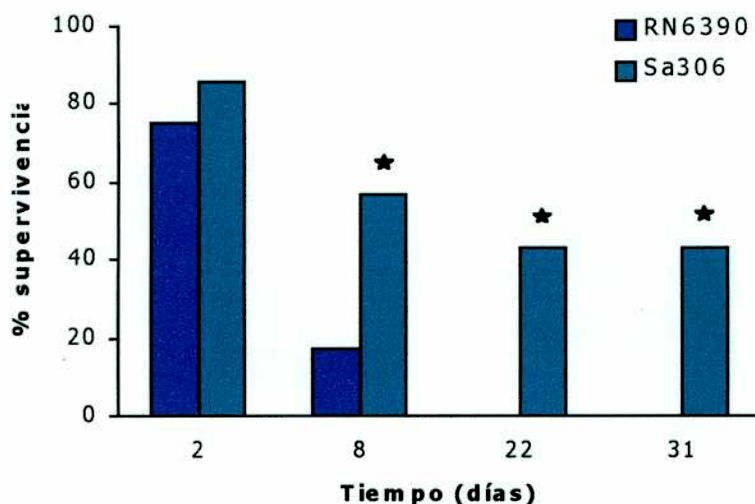


Figura 18: Supervivencia de los animales inoculados con distintas cepas de *S. aureus*. Ratones Swiss se inocularon por vía iv con (2×10^7 UFC/ratón) de la mutante *Sa306* o de la cepa parental RN6390. Para cada tiempo, se comparó el % de supervivencia del grupo inoculado con RN6390 vs el grupo inoculado con *Sa306*. *Nivel de significación: 8 d ($p=0,04$; test exacto de Fisher); 22 y 33 d ($p=0,01$; test exacto de Fisher).

3.7.2.3 Estudios histopatológicos

A fin de establecer si hubo una causa de muerte diferencial entre los animales inoculados con la mutante *Sa306* o con la cepa parental RN6390 se analizaron secciones histopatológicas de diferentes tejidos en el tiempo.

3.7.2.3.1 Estudio histopatológico de ratones inoculados con dosis letales de las cepas RN6390 o *Sa306*

Con el objeto de evaluar el grado de atenuación de la mutante *Sa306* por medio del análisis histopatológico de animales infectados según el modelo de infección sistémica por diseminación hematógena se administraron dosis bacteriana altas. Para ello, los ratones se inyectaron por vía iv con de una suspensión de RN6390 ($3,4 \times 10^7$ UFC/ratón) o de *Sa306* ($6,9 \times 10^7$ UFC/ratón). A distintos tiempos (5, 24 y 72 h) los

animales se sacrificaron y se extirparon el bazo, el corazón, los riñones, los pulmones y el cerebro de cada animal. Los órganos se lavaron en SF y se mantuvieron en una solución de formalina al 10% hasta su procesamiento. Como consecuencia de la administración de dosis mayores a la DL_{50} , durante el transcurso del experimento se produjo la muerte de algunos animales. Por tal motivo, un único ratón de los cuatro inoculados integró el grupo de 72 h. Por el contrario, los cuatro animales inoculados con *Sa306* integraron el grupo de 72 h. La evaluación histológica realizada por el patólogo reveló que las anormalidades histopatológicas fueron aparentes a las 24 h post-inoculación de la cepa parental RN6390, y recién a las 72 h del desafío con la mutante *Sa306*. El número y tamaño de los abscesos en los ratones inoculados con RN6390 fue compatible con la causa de muerte relacionado al compromiso parenquimatoso y sus consecuencias funcionales. En conclusión, este proceso fue menos severo en los animales infectados con la mutante *Sa306* (Figura 19).

3.7.2.3.2 Estudio histopatológico de ratones inoculados con dosis subletales de las cepas RN6390 o *Sa306*

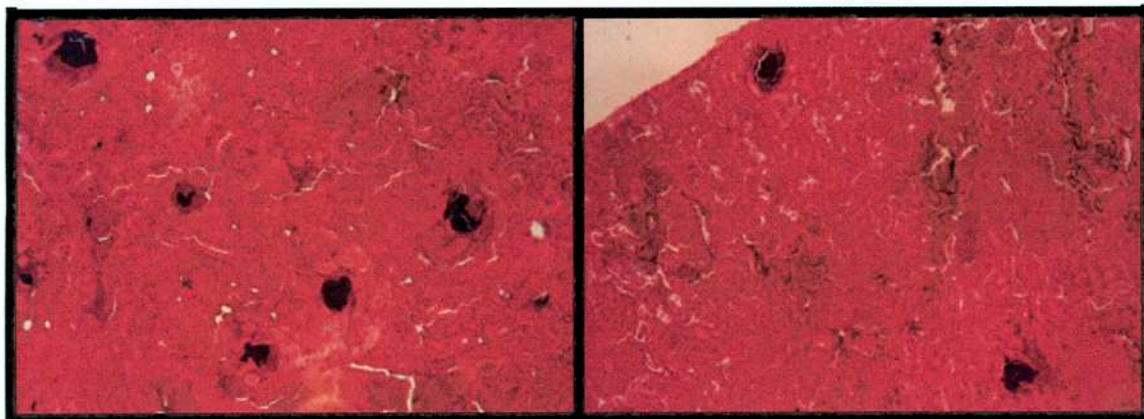
En vista de los resultados detallados en el párrafo superior se decidió evaluar el grado de atenuación de la mutante *Sa306* en el modelo de infección sistémica por diseminación hematogena por administración de bajas dosis bacterianas. En este caso, los animales se inyectaron por vía iv con de una suspensión de RN6390 ($7,3 \times 10^5$ UFC/ratón) o de *Sa306* ($9,4 \times 10^5$ UFC/ratón). A distintos tiempos (1, 3 y 6 d) se extirparon los órganos que se fijaron en una solución de formalina al 10% hasta su procesamiento. El análisis histológico reveló que la infección de los animales inyectados por vía iv con dosis bajas de la mutante *Sa306* fue menos severa en comparación a la observada en los animales control (Figura 20).

Por lo tanto, la mutante *Sa306*, inoculada en dosis letales o subletales, mostró respecto a la cepa parental RN6390 un importante grado de atenuación que podría deberse a la replicación limitada de la mutante *aroA* en los tejidos debido a la escasa disponibilidad de PABA en los mamíferos.

Día 1

RN6390

Sa306



Día 3

RN6390

Sa306

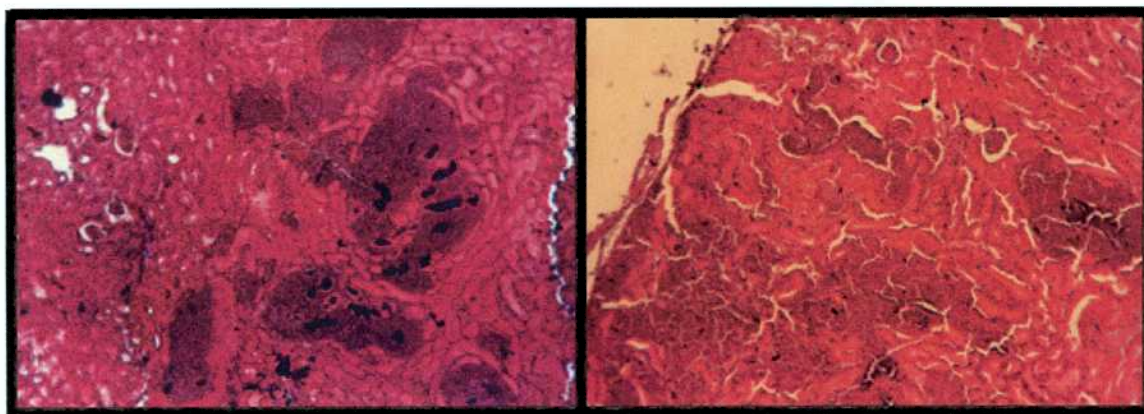
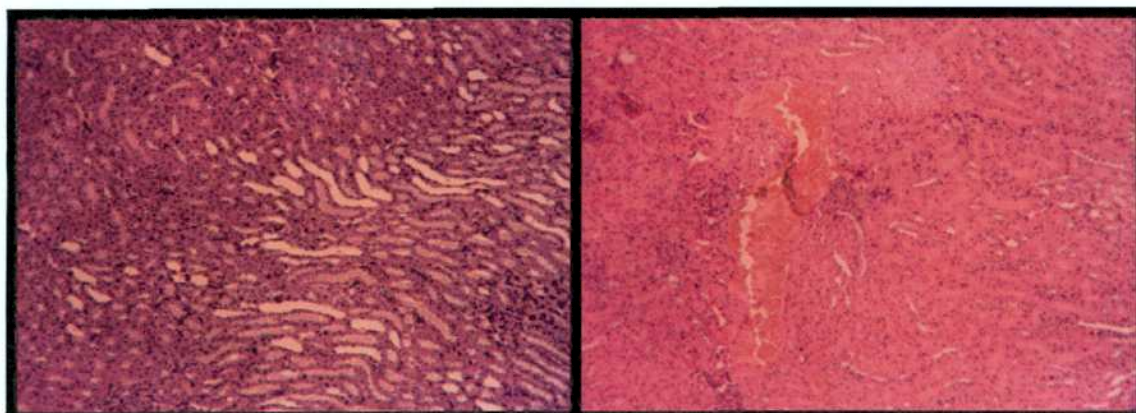


Figura 19: Estudio histopatológico del tejido renal de ratones inoculados con dosis letales de distintas cepas de *S. aureus*. Los animales se inocularon con la mutante *Sa306* ($6,9 \times 10^7$ UFC/ratón) o la cepa parental RN6390 ($3,4 \times 10^7$ UFC/ml) por vía iv. *Panel superior:* tejido renal observado a las 24 h post-inoculación (100x). *Panel inferior:* tejido renal observado a las 72 h post-inoculación (100x).

Día 3

RN6390

Sa306



Día 6

RN6390

Sa306

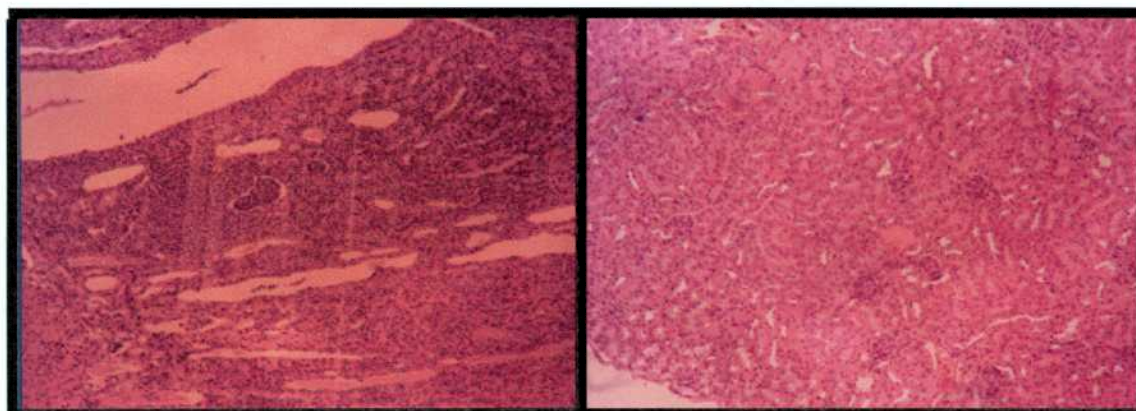


Figura 20: Estudio histopatológico del tejido renal de ratones inoculados con dosis subletales de distintas cepas de *S. aureus*. Los animales se inocularon con la mutante Sa306 ($9,4 \times 10^5$ UFC/ml) o la cepa parental RN6390 ($7,3 \times 10^5$ UFC/ml) por vía iv. *Panel superior:* tejido renal observado a los 3 d post-inoculación (izquierda 50x, derecha 100x). *Panel inferior:* tejido renal observado a los 6 d post-inoculación (izquierda 50x, derecha 100x).

3.7.3 Conclusiones parciales

La utilización de un modelo murino letal de inoculación por vía ip permitió establecer la influencia de la auxotrofia, *aroA*, en la virulencia estafilocócica. Los resultados previamente descriptos demostraron que la mutante *Sa306* fue atenuada (DL_{50} : 1×10^6 UFC/ratón) respecto de la cepa parental virulenta RN6390 (DL_{50} : $6,3 \times 10^4$ UFC/ratón) dado que se determinó que se requiere una dosis de la mutante *Sa306* 16 veces superior a la DL_{50} de RN6390 para producir la muerte de la mitad de los animales infectados por vía ip. Por otro lado, se observó un 0% de supervivencia en los ratones inoculados con la cepa parental RN6390 por vía ip. Por el contrario, se determinó un 46% de supervivencia en los ratones infectados con la mutante por vía ip. Además, se estableció en el modelo murino de infección hematogena que la mutante *Sa306* fue atenuada respecto a la cepa parental RN6390. Esta conclusión surge de que a los 22 d de producida la inoculación, se observó un porcentaje de supervivencia significativamente mayor (43%) en los ratones inoculados con *Sa306* respecto del establecido para los animales infectados con RN6390 (0%). Asimismo, la evaluación histopatológica reveló que el proceso que condujo a la muerte de los animales infectados por vía iv con la mutante fue menos severo que en los animales inoculados con la cepa parental. En conclusión, los resultados sugieren que la mutación en el gen *aroA* de la mutante *Sa306* podría ser la causa de la atenuación de la virulencia.

OBJETIVO 8

Permanencia en tejido de las cepas de *S. aureus* usando dos modelos murinos de infección sistémica

3.8.1 Permanencia en tejido de las cepas de *S. aureus* inoculadas por vía ip

A fin de estudiar la permanencia en tejido de la mutante *Sa306* y de la cepa parental RN6390 se determinó el número de bacterias en sangre, bazo y pulmón de ratones normales inoculados por vía ip. En una primera etapa se realizaron experimentos preliminares con el objeto de establecer la dosis bacteriana adecuada

para recuperar de los distintos tejidos un número contable de bacterias. Para ambas cepas, se determinó el inóculo igual a $6-7 \times 10^6$ UFC/ratón como apropiado. Luego de la inoculación por vía ip, se extrajeron a distintos tiempos (1, 3 y 5 h) muestras de sangre, el bazo y los pulmones de cada animal. A las 3 h post-inoculación, se observó una disminución estadísticamente significativa en el crecimiento de la mutante *Sa306* respecto de la cepa parental RN6390 en los diferentes tejidos (Tabla 11). A pesar de que no fue estadísticamente significativa, al cabo de 5 h de inoculada la mutante *Sa306* se observó una marcada disminución del número de UFC/ml en los diferentes tejidos respecto a lo establecido para la cepa RN6390 (Tabla 12). Por lo tanto, cuando las bacterias se administraron por vía ip se estableció que la permanencia en tejido de *Sa306* fue bastante menor que la observada para RN6390.

Por otro lado, no se registró la muerte de ningún animal inoculado con *Sa306* dentro del período de tiempo del estudio (5 h). Algunos ratones infectados con la cepa RN6390 murieron entre las 4-5 h post-inoculación, y por lo tanto no se incluyeron en el experimento. Sin embargo, esta observación permitió confirmar el grado de atenuación de la mutante *Sa306* determinado previamente. Debido a que se demostró (párrafo 3.5.2) que no existieron diferencias en la velocidad de crecimiento *in vitro* entre la mutante *Sa306* y la cepa parental RN6390, se puede concluir que la permanencia menor en tejido de *Sa306* comparada con RN6390 se debería a cierta incapacidad de la mutante *Sa306* para replicar *in vivo*.

Tabla 11: Permanencia en diferentes tejidos de *Sa306* y RN6390 medida a las 3 h

Tejido ($6,7 \times 10^6$ UFC/ratón)	Mediana de las UFC/ml (% recuperación)		Nivel de Significación ^a
	RN6390	<i>Sa306</i>	
Sangre	3×10^3 (0,044%)	$2,7 \times 10^3$ (0,040%)	$p=0,0001^*$
Bazo	$4,8 \times 10^6$ (71,64%)	$6,2 \times 10^5$ (9,25%)	$p=0,04^*$
Pulmón	$4,4 \times 10^5$ (6,56%)	$4,6 \times 10^4$ (0,68%)	$p=0,002^*$

^a Nivel de significación: UFC/ml de RN6390 vs UFC/ml de *Sa306* en cada tejido, test Mann-Whitney de suma de rangos. *Significativo: $p < 0,05$.

Tabla 12: Permanencia en diferentes tejidos de *Sa306* y RN6390 medida a las 5 h

Tejido ($6,7 \times 10^6$ UFC/ratón)	Mediana de las UFC/ml (% recuperación)		Nivel de Significación ^a
	RN6390	<i>Sa306</i>	
Sangre	3×10^2 (0,004%)	0 (0%)	$p > 0,5$ (NS)
Bazo	$6,9 \times 10^6$ (>100%)	$6,2 \times 10^5$ (9,25%)	$p > 0,5$ (NS)
Pulmón	$1,4 \times 10^5$ (2,08%)	$4,6 \times 10^4$ (0,68%)	$p > 0,5$ (NS)

^a Nivel de significación: UFC/ml de RN6390 vs UFC/ml de *Sa306* en cada tejido, test Mann-Whitney de suma de rangos. No significativo (NS): $p > 0,05$.

3.8.2 Permanencia en tejido de las cepas de *S. aureus* inoculadas por vía iv

Con el objeto de estudiar la permanencia en tejido de la mutante *Sa306* y de la cepa parental RN6390 diseminadas por vía hematológica se investigó el número de bacterias en sangre y pulmón de ratones normales inyectados por ruta iv. Los animales se inocularon con $6,5 \times 10^7$ UFC/ratón de la suspensión bacteriana respectiva. A diferentes tiempos (1, 5 y 24 h) se extrajeron muestras de sangre de los ratones. Luego, los animales se sacrificaron y se extirparon los pulmones. Una hora después de la inoculación, se observó en el tejido pulmonar una disminución estadísticamente significativa en el número ($3,3 \times 10^4$) de UFC/ml correspondientes a la mutante *Sa306* comparado con las UFC/ml ($1,3 \times 10^5$) de la cepa parental RN6390 (Tabla 13). Transcurrida una hora de la inoculación se estableció en sangre una marcada disminución en las UFC/ml de *Sa306* respecto de las UFC/ml de RN6390 recuperadas (Tabla 13). Por otro lado, a las 24 h de la infección se determinó un agudo descenso del número de UFC/ml respecto a los valores hallados a la hora de transcurrida la inoculación bacteriana. Sin embargo, a las 24 h no se observaron diferencias significativas en ambos tejidos entre los valores de UFC/ml de *Sa306* comparados con los de RN6390 (Tabla 14). Por otro lado, cuando se compararon los valores obtenidos de *Sa306* en sangre y pulmón se estableció que la disminución de las UFC/ml a las 24 h fue estadísticamente significativa respecto de las UFC/ml observadas a 1 h (*Sangre*: $5,2 \times 10^3$ UFC/ml (T1) vs 0 UFC/ml (T24), $p=0,03$; ; test Mann-Whitney de suma de rangos. *Pulmón*: $3,3 \times 10^4$ UFC/ml (T1) vs $2,4 \times 10^2$ UFC/ml (T24), $p=0,017$; test Mann-

Whitney de suma de rangos) (Tablas 13 y 14). Resultados similares se obtuvieron con la cepa parental RN6390 (*Sangre*: $1,1 \times 10^4$ UFC/ml (T1) vs 4×10^2 UFC/ml (T24), $p=0,015$; test Mann-Whitney de suma de rangos. *Pulmón*: $1,3 \times 10^5$ UFC/ml (T1) vs $9,5 \times 10^3$ UFC/ml (T24), $p=0,004$; test Mann-Whitney de suma de rangos) (Tablas 13 y 14).

Por otro lado, en todos los casos el porcentaje de bacteria recuperada de los tejidos estudiados respecto del inóculo inicial fue muy bajo (valores inferiores al 1%). Sin embargo, esto no impidió evaluar el crecimiento de la mutante *in vivo*. Teniendo en cuenta el conjunto de resultados se puede concluir que la permanencia de la mutante *Sa306* inoculada por vía hematogena fue marcadamente menos prolongada respecto a la cepa parental RN6390. Por lo tanto, la disminuida capacidad de crecimiento *in vivo* de *Sa306* sería la causa de una menor permanencia en tejido respecto de la cepa parental.

Tabla 13: Permanencia en diferentes tejidos de *Sa306* y RN6390 medida a 1 h

Tejido ($6,5 \times 10^7$ UFC/ratón)	Mediana de las UFC/ml (% recuperación)		Nivel de Significación ^a
	RN6390	<i>Sa306</i>	
Sangre	$1,1 \times 10^4$ (0,017%)	$5,2 \times 10^3$ (0,008%)	$p > 0,5$
Pulmón	$1,3 \times 10^5$ (0,2%)	$3,3 \times 10^4$ (0,05%)	$p = 0,04^*$

^a Nivel de significación: UFC/ml de RN6390 vs UFC/ml de *Sa306* en cada tejido, test Mann-Whitney de suma de rangos. *Significativo: $p < 0,05$.

Tabla 14: Permanencia en distintos tejidos de *Sa306* y RN6390 medida a las 24 h

Tejido ($6,5 \times 10^7$ UFC/ratón)	Mediana de las UFC/ml (% recuperación)		Nivel de Significación ^a
	RN6390	<i>Sa306</i>	
Sangre	4×10 (0,0006%)	0^3 (0%)	NS
Pulmón	$9,5 \times 10^3$ (0,015%)	$2,4 \times 10^2$ (0,0003%)	NS

^a Nivel de significación: UFC/ml de RN6390 vs UFC/ml de *Sa306* en cada tejido, test Mann-Whitney de suma de rangos. No significativo (NS): $p > 0,05$.

3.8.3 Determinación de la producción de MPO por LPMN en homogenatos pulmonares inducida por las cepas de *S. aureus*

Entendiéndose por virulencia a la capacidad relativa de un microbio para causar daño en un huésped (32, 33), el daño ocasionado por la respuesta inflamatoria del huésped infectado con *S. aureus* podría ser evaluado para caracterizar la virulencia de la mutante *Sa306 araA*.

Los leucocitos polimorfonucleares (LPMN) tienen vital importancia durante los procesos infecciosos, dado que constituyen la primera línea de defensa frente a la invasión de *S. aureus*. Por ello, se evaluó indirectamente la respuesta inflamatoria que se indujo luego de la inoculación bacteriana, considerando al tejido pulmonar como representativo del sitio de infección. Para tal fin se determinó la actividad de mieloperoxidasa (MPO), una enzima producida por los LPMN, como un parámetro indirecto de la reacción inflamatoria en los homogenatos pulmonares de ratones infectados con las cepas de *S. aureus* en estudio.

3.8.3.1 Producción de MPO inducida por la mutante *Sa306* y la cepa RN6390 inoculadas por vía ip

Para la evaluación de la reacción inflamatoria inducida por la mutante *Sa306* se midió la actividad de MPO en los pulmones de los ratones que integraron los distintos grupos experimentales de permanencia bacteriana en tejido (sección 3.8.1). Para ello, los homogenatos pulmonares se conservaron a -20°C hasta el momento de su procesamiento para medición de la actividad enzimática. Antes del congelamiento se realizó la lisis de los eritrocitos de cada muestra. Siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos se determinó la actividad de MPO en homogenatos pulmonares de ratones inoculados por vía ip con la mutante *Sa306*, la cepa parental RN6390 o en animales control (inoculados sólo con LV). Por otro lado, no se establecieron diferencias en la actividad de MPO entre el grupo de animales normales sin inocular (N) y el grupo de ratones control (C) (N: 1,11 unidades de MPO vs C: 1,01 unidades de MPO, $p > 0,5$, test Mann-Whitney de suma de rangos). Por lo tanto, la suspensión de

extracto de levadura no indujo la activación de los LPMN pulmonares. Por otro lado, la administración de la mutante *Sa306* por vía ip indujo una respuesta inflamatoria pulmonar que alcanzó el máximo a las 3 h de la inoculación y de ahí en adelante disminuyó significativamente (Tabla 15). Por lo tanto, el arribo de la mutante *Sa306* al pulmón indujo una respuesta inflamatoria transitoria medida como actividad de MPO pulmonar después del desafío por vía ip. Sin embargo, la actividad de MPO pulmonar de los animales inoculados con la cepa parental RN6390 alcanzó un máximo al tiempo del arribo bacteriano pero, de ahí en más, no retornó a los niveles basales (Tabla 15).

Tabla 15: Actividad de MPO en homogenatos pulmonares de ratones inoculados por vía ip con la mutante *Sa306* o la cepa parental RN6390

Tiempo (h)	Medianas (unidades de MPO) ^a	
	RN6390	<i>Sa306</i>
3	1,89	1,86
5	1,67	1,31
Nivel de significación ^b	p>0,5	p=0,004*

^a Actividad de MPO grupo control: 1,01 unidades de MPO. ^b T3 vs T5, test Mann-Whitney de suma de rangos. *Significativo: p<0,05.

Asimismo, los resultados del presente experimento se correlacionaron con los obtenidos cuando se evaluó la permanencia de *Sa306* y de RN6390 en el tejido pulmonar de los ratones inoculados por vía ip.

3.8.3.2 Producción de MPO inducida por la mutante *Sa306* y la cepa RN6390 inoculadas por vía iv

Para la evaluación de la reacción inflamatoria inducida por la mutante *Sa306* y siguiendo el esquema de trabajo descrito en el párrafo anterior se determinó la actividad de MPO en pulmones de ratones inoculados por vía iv con la mutante *Sa306* o la cepa parental RN6390. Una hora después de la inoculación de la cepa RN6390 por vía iv, se observó un aumento significativo respecto del control en la producción de

MPO pulmonar que se mantuvo en el tiempo hasta su descenso a valores normales a las 24 h (Tabla 16). Por el contrario luego de transcurridas 3 h de la inoculación por vía iv, la actividad de MPO pulmonar de los ratones infectados con *Sa306* aumentó significativamente pero se observó que rápidamente descendió a niveles normales (Tabla 16).

Tabla 16: Actividad de MPO en homogenatos pulmonares de ratones inoculados por vía iv con la mutante *Sa306* o la cepa parental RN6390

Tiempo (h)	Medianas (unidades de MPO)	
	RN6390	<i>Sa306</i>
1	1,73 (p=0,01)*	1,49 (p=0,18)
3	1,15 (p=0,01)*	1,70 (p=0,001)*
5	1,21 (p=0,01)*	1,13 (p=0,33)
24	1,06 (p>0,5)	1,00 (p>0,5)

Nivel de significación: el valor de cada tiempo se comparó con el control (1,01 unidades de MPO), test Mann-Whitney de suma de rangos. *Significativo: p<0,05.

Por otro lado, se pudo establecer cierta correlación entre los resultados del presente experimento y los obtenidos cuando se evaluó la permanencia de las cepas estudiadas en el pulmón de ratones inoculados por vía iv.

3.8.4 Conclusiones parciales

En ambos modelos, el estudio de permanencia estableció la incapacidad de la mutante *Sa306* para proliferar en los tejidos estudiados respecto a la cepa parental RN6390. Estos resultados correlacionaron con la magnitud de la respuesta inflamatoria (medida como actividad de MPO pulmonar) inducida por las cepas en estudio. Sólo se estableció un transitorio aumento en la producción de MPO cuando la mutante arribó al tejido pulmonar. Sin embargo, la actividad de MPO se observó aumentada al tiempo en que la cepa RN6390 arribó al pulmón y se mantuvo en el tiempo. Los resultados mostraron que la mutante *Sa306* no indujo una respuesta inflamatoria significativa en el

tejido pulmonar del huésped siendo esto un reflejo de la virulencia (capacidad relativa de la bacteria para causar daño en el huésped) disminuida de la mutante auxótrofa respecto de la cepa parental RN6390. Por lo tanto, los resultados sugerirían que la mutación en el gen *aroA* de la mutante *Sa306* afectaría la replicación de la bacteria en los tejidos murinos estudiados. Además, se podría considerar que la capacidad relativa de esta mutante *aroA* para causar daño tisular no sería significativa.

OBJETIVO 9

Evaluación de la capacidad inmunogénica de la mutante atenuada *Sa306*

Estos experimentos fueron realizados con el propósito de determinar la capacidad inmunogénica de la mutante *Sa306* (*aroA*) de *S. aureus*.

3.9.1 Protección sistémica inducida por inmunización con *Sa306*

Con el objeto de determinar si la inmunización ip con la mutante *Sa306* confería protección sistémica contra el desafío con la cepa RN6390 se evaluó la mortalidad de animales inmunizados y los respectivos controles. Inicialmente, se determinó la dosis inmunizante óptima como 10^7 UFC/ratón administrada por vía ip. El esquema de vacunación consistió en 3 inmunizaciones con la dosis óptima de la mutante *Sa306* administradas cada 7 d por ruta ip. Al séptimo día de la tercera inmunización (día 21) se desafiaron los ratones por vía ip con 8 DL₅₀ de la cepa parental virulenta RN6390 (5×10^5 UFC/ratón). Cabe señalar que la mutante *Sa306* se suspendió en SF estéril, mientras que la cepa parental RN6390 se suspendió de acuerdo al modelo murino de infección letal, en extracto de levadura al 2% en caldo cerebro-corazón.

Posteriormente al desafío, se registró la muerte de los animales a diario. Se estableció el 0% de supervivencia (muertos/total: 28/28) de los animales del grupo control (no inmunizados y desafiados), mientras que se observaron 16 ratones inmunizados supervivientes de un total de 31 ratones inmunizados. Los ratones inmunizados supervivientes no mostraron signos de enfermedad (pérdida de peso,

letargo, pelaje alterado, etc). Por lo tanto, se sacrificaron al mes de realizado el desafío. Mediante este esquema de inmunización con *Sa306* se estableció un índice protectorio de 52% estadísticamente significativo ($p=2 \times 10^{-6}$, test exacto de Fisher) (Figura 21).

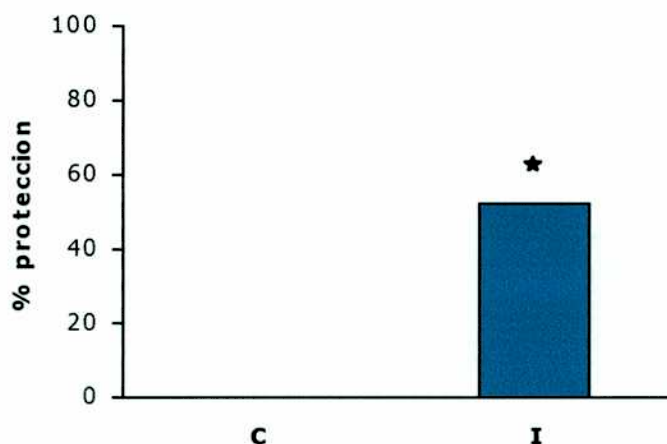


Figura 21: Protección sistémica inducida por la mutante *Sa306*. Ratones Swiss recibieron por vía ip 3 dosis inmunizantes (1×10^7 UFC/ratón) de la mutante *Sa306* cada 7 d. El desafío con la cepa parental RN6390 (5×10^5 UFC/ratón) se realizó por vía ip luego de 7 d de la última inmunización. * Control (0%) vs Inmunizados (52%); $p=2 \times 10^{-6}$; test exacto de Fisher.

Por lo tanto, la mutante *Sa306* confirió una significativa protección sistémica frente al desafío con la cepa parental virulenta RN6390, lo que demuestra su inmunogenicidad y capacidad protectoria a nivel sistémico.

3.9.2 Protección local inducida por inmunización con *Sa306*

3.9.2.1 Desafío local con la cepa homóloga RN6390

Con el objeto de evaluar el grado de protección local que confería la mutante *Sa306* se estudió el efecto de la inmunización en glándula mamaria murina. Para ello, durante la última semana de la preñez se realizó la primera inmunización con *Sa306*

(5×10^5 UFC/mama) por vía intramamaria (ima). Siete días más tarde se administró una segunda dosis inmunizante por la misma ruta. A los 14 d de producido el parto, los animales se desafiaron localmente con la cepa parental virulenta RN6390 (5×10^5 UFC/mama). Transcurridas 96 h del desafío, se evaluó la colonización de la glándula mamaria de los animales de los grupos inmunizados y control. El número de UFC totales de RN6390 en la glándula mamaria fue significativamente menor en los animales inmunizados (*I*: 130 UFC totales vs *C*: 1088 UFC totales, $p < 0,0001$; test Mann-Whitney de suma de rangos) (Figura 22). Estos resultados demuestran que la inmunización local con la mutante *Sa306* confiere protección en la glándula mamaria contra el desafío con la cepa patógena, como se infiere indirectamente a partir de los datos obtenidos.

3.9.2.2 Desafío local con una cepa de *S. aureus* heteróloga

A fin de establecer si la inmunización local con *Sa306* confería protección frente al desafío con una cepa de *S. aureus* heteróloga se realizaron estudios tendientes a escoger un aislamiento clínico bovino representativo. Para ello se consideraron los resultados obtenidos durante la primera etapa del trabajo, se seleccionó la cepa de *S. aureus* MB319 aislada de leche de un bovino con mastitis debido a que presentaba el genotipo (A/I) más prevalente en la naturaleza para el tiempo estudiado y que además no reaccionó (NR) con los anticuerpos específicos anti-PC5 o PC8. Asimismo, se estableció que la cepa MB319 portaba el grupo de genes *cap5* aunque no expresó *in vitro* valores apreciables del PC5.

Posteriormente, se estableció la virulencia de la cepa MB319 de *S. aureus* mediante la determinación de la DL_{50} mediante la inoculación de ratones por vía ip. Siguiendo la metodología descrita en el párrafo 3.7.1, se observó que la administración por vía ip de MB319 suspendida en extracto de levadura al 2% en caldo cerebro-corazón provocó la muerte de los animales, siendo la DL_{50} igual a $3,2 \times 10^5$ UFC/ratón.

Por otro lado y siguiendo el esquema de inmunización local del párrafo 3.9.2.1, grupos de ratones hembra inmunizados con *Sa306* por vía ima se desafiaron con una

suspensión de la cepa MB319 (1×10^6 UFC/mama) por la misma ruta. A las 96 h de la administración de la cepa heteróloga se determinó que el número de UFC de MB319 recuperadas de glándula mamaria fue significativamente menor en el grupo de animales inmunizados (I : 30 UFC totales *vs* C : 120 UFC totales; $p=0,0047$; test Mann-Whitney de suma de rangos) (Figura 23). Por lo tanto, la disminución en el grado de colonización de la glándula mamaria por la cepa heteróloga MB319 podría correlacionarse indirectamente con la protección conferida por la inmunización local con la mutante *Sa306*.

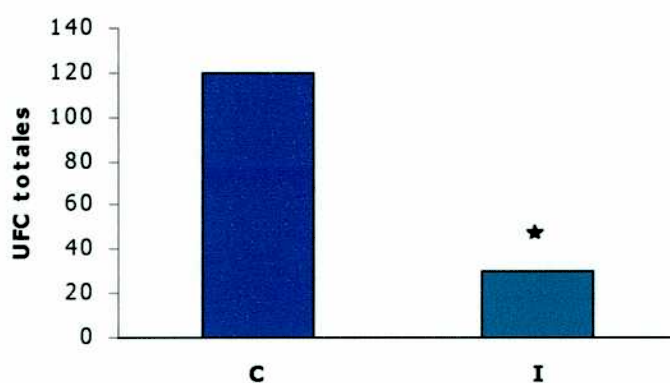


Figura 22: Protección local inducida por la mutante *Sa306* frente al desafío con la cepa homóloga RN6390. Ratones hembra Swiss recibieron 2 dosis inmunizantes (5×10^5 UFC/ratón) de la mutante *Sa306* por vía intramamaria (ima). El inóculo del desafío con la cepa parental RN6390 (5×10^5 UFC/ratón) se administró por vía ima. En el eje de ordenadas se graficaron las medianas de las UFC totales en glándula mamaria ($n=9$). * Control (1088 UFC totales) *vs* Inmunizados (130 UFC totales); $p < 0,0001$; test Mann-Whitney de suma de rangos.

3.9.3 Conclusiones parciales

La mutante *Sa306* fue capaz de otorgar protección sistémica contra el desafío con la cepa parental RN6390. El índice protectivo (52%) fue estadísticamente significativo ($p=2 \times 10^{-6}$, test exacto de Fisher). Asimismo, la mutante *Sa306* confirió protección local que estuvo indirectamente relacionada a la disminución significativa de la colonización de la glándula mamaria por la cepa parental RN6390 y por una cepa

heteróloga de *S. aureus* (MB319). Cabe mencionar que la tipificación de la cepa MB319 mostró que presentaba el genotipo (A/I) más prevalente de la población estudiada y que se clasificó como no reactiva (NR) debido a que no expresó PC5 ni PC8. Por lo tanto, la mutante *aroA* aislada induciría protección de la glándula mamaria murina contra la cepa homóloga (RN6390) y frente a una cepa virulenta de *S. aureus* con genotipo y fenotipo capsular más prevalente en nuestra región durante el período bajo escrutinio.

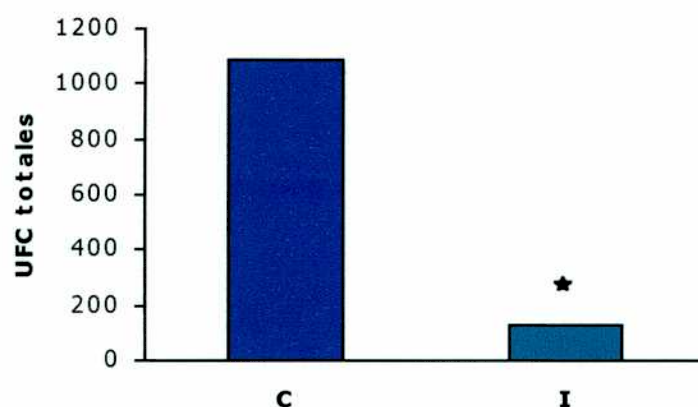


Figura 23: Protección local inducida por la mutante *Sa306* frente al desafío con la cepa heteróloga MB319. Ratones hembra Swiss recibieron 2 dosis inmunizantes (5×10^5 UFC/ratón) de la mutante *Sa306* por vía intramamaria (ima). El inóculo del desafío con la cepa MB319 (1×10^6 UFC/ratón) se administró por vía ima. En el eje de ordenadas se graficaron las medianas de las UFC totales en glándula mamaria (n=8). * Control (120 UFC totales) vs Inmunizados (30 UFC totales); $p < 0,0047$; test Mann-Whitney de suma de rangos.

OBJETIVO 10

Identificación de la mutante auxótrofa *Sa306* entre aislamientos clínicos de *S.aureus*

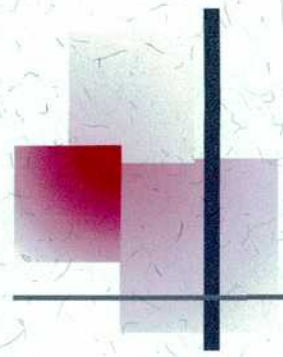
La mutante *Sa306* demostró ser atenuada y confirió protección sistémica y local. Por lo tanto, estos resultados permitirían especular sobre la posibilidad de utilizar con éxito mutantes de *S. aureus aroA* para el diseño de vacunas vivas atenuadas. Sin

embargo, es prioritario discriminar inequívocamente el genoma de la mutante *Sa306* entre los aislamientos clínicos bovinos para identificar posibles brotes infecciosos en los individuos vacunados en futuras pruebas de campo. Para ello, en primera instancia se escogió la MECP como método de tipificación de la cepa vacuna debido a su alto poder discriminatorio (ID: 0,91). El patrón de MECP de la mutante *Sa306* difirió en más de siete bandas respecto al perfil establecido para cada aislamiento. Esto demuestra que la mutante *Sa306* sería genéticamente diferente al resto de los aislamientos clínicos estudiados. Además, la mutante *Sa306* se identificó con el genotipo Q1, similar al de la cepa parental RN6390 (Figuras 6 y 7).

Por otro lado, la ribotipificación automatizada permitió identificar a la mutante (ribotipo IX) y su cepa parental (ribotipo X) del resto de los aislamientos clínicos bovinos. Por lo tanto, a pesar del moderado poder discriminatorio de la ribotipificación automatizada se estableció que la mutante auxótrofa pudo ser discriminada de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis.

3.10.1 Conclusiones parciales

El genoma de la mutante *Sa306* pudo ser fácilmente discriminado entre los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* mediante la MECP como método de tipificación molecular. Se estableció que el genotipo de MECP para *Sa306*, denominado Q1, difirió en más de 7 bandas respecto a los genotipos establecidos para cada aislamiento. Por lo tanto de acuerdo a los criterios más rigurosos de análisis de los polimorfismos de MECP, la mutante *Sa306* fue genéticamente diferente del resto de los aislamientos estudiados.



Discusión



La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* continúa siendo un grave problema a nivel mundial debido a las importantes pérdidas económicas que ocasiona en la industria lechera. Una forma de disminuir el impacto de la mastitis en los tambos es inducir la inmunidad de los bovinos para resistir a la infección por *S. aureus*. Es continuo el interés en lograr un procedimiento inmunoproláctico efectivo que prevenga la enfermedad. Al respecto, durante la última década se han arribado a conclusiones contradictorias y no del todo satisfactorias en cuanto a eficiencia de vacunas se refiere (59). En la actualidad, la práctica más común está basada en medidas apropiadas de higiene, en reducir la exposición a los patógenos ambientales y en terapia antibiótica en el período seco de la vaca. La información disponible en el tema indica que se requieren nuevas estrategias para el control y/o prevención de la mastitis bovina.

En este trabajo de investigación se puso especial énfasis en el aislamiento y caracterización de una mutante auxótrofa de *S. aureus* que fuera estable, atenuada, inmunogénica e identificable entre la población de aislamientos clínicos bovinos. El fin último del proyecto es contribuir al logro de la prevención de la mastitis utilizando como estrategia inmunoproláctica la inmunización local con cepas vivas atenuadas apropiadas. De esta manera, se espera aportar información que pueda ayudar a resolver el grave problema que representa la mastitis bovina en países con importante industria ganadera.

4.1 Evaluación genealógica de aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis

S. aureus ha emergido como uno de los patógenos más importante que causan la mastitis bovina. Una vez establecido en el tejido mamario de la vaca, esta bacteria patógena es muy difícil de erradicar (138). La terapia con antibióticos parece ser con frecuencia inefectiva (166) y ha sido enunciada la hipótesis que un mejor conocimiento de la distribución de las cepas infectivas en los rebaños lecheros podría ayudar en la formulación de estrategias para reducir la diseminación de la infección intramamaria (91). La mayoría de los estudios epidemiológicos moleculares sobre aislamientos

clínicos bovinos de *S. aureus* fueron realizados con muestras de Europa y Norte América, siendo los datos provenientes de Sud América sumamente escasos (103).

Por medio del análisis de los perfiles de MECP se determinó la presencia de un grupo prevalente (grupo 1) en Argentina, que incluyó al 85,8% de los aislamientos bovinos de *S. aureus* estudiados. Asimismo, se estableció que el tipo A perteneciente al grupo 1 estuvo integrado por 44 aislamientos indistinguibles unos de otros. El predominio de un número reducido de genotipos fue también observado en estudios previos aplicando métodos fenotípicos y genotípicos (4, 91, 130). Sin embargo, la naturaleza del proceso que llevó a la selección de un número limitado de clones infectantes en las vacas lecheras no pudo ser demostrada. Posiblemente, los genotipos prevalentes de *S. aureus* hayan desarrollado mecanismos que les permitan infectar la glándula mamaria bovina con éxito.

De acuerdo a los resultados hallados, las cepas que formaron parte del grupo mayoritario fueron aisladas durante toda la etapa de escrutinio. Más aún, los aislamientos con genotipo A/I fueron también encontrados a lo largo del período total del estudio, aunque en muy baja prevalencia en el transcurso final del mismo. Aunque la REAP reveló una marcada diferencia en los perfiles plasmídicos entre los aislamientos A/I, nuestros resultados sugieren que el cromosoma de *S. aureus* pudo haber sufrido sólo cambios menores durante el estudio, como fue observado por medio de la MECP y la ribotipificación automatizada. En un trabajo con diferentes especies de *Staphylococcus*, se concluyó que hubo una variabilidad genética considerable en *S. aureus* (152). La discrepancia al respecto entre ambos estudios podría ser atribuida a la procedencia diferente de las muestras. En nuestro trabajo, los aislamientos clínicos estudiados representan al país como un todo sobre un período amplio de años y, por esta razón, es concebible en este caso que una cepa de *S. aureus* pudo haber sido diseminada a través de la región y que sólo mínimos cambios genéticos ocurrieron durante varios años en Argentina. Se desconoce si las cepas del grupo 1 se diseminaron por la Argentina a partir de una única fuente. Ulteriores estudios deberían realizarse para asegurar si las cepas de *S. aureus* pertenecientes al grupo 1 pueden encontrarse en otras regiones fuera de Argentina.

Por otro lado, se estableció que en Argentina hubieron dos genotipos predominantes (A/I y A11/VI) que correspondieron al 39% de los aislamientos de *S. aureus* estudiados. La MECP y la ribotipificación presentaron un alto nivel de concordancia en la identificación de los dos genotipos mayoritarios. La asociación entre la identidad clonal del tipo A ó A11 de MECP y el ribotipo I ó VI, respectivamente, sugeriría que los aislamientos con estos genotipos podrían tener alguna característica que les de a ellos una ventaja sobre otras cepas para sobrevivir en el ambiente, colonizar la ubre bovina y/o causar enfermedad aparente. Al respecto, Fitzgerald *et al* (49, 50) demostraron que unos pocos clones especializados podrían ser los responsables de casos de mastitis bovina y que estos clones podrían tener una distribución geográfica amplia. Un estudio previo determinó que cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis fueron en su mayoría refractarias a la muerte por leucocitos polimorfonucleares (1) lo que sugeriría que un cierto rasgo podría estar asociado a la patogenicidad de esta bacteria en los bovinos. Se puede especular que los patógenos que son más eficientes en evitar los mecanismos de defensa del huésped podrían ser los genotipos más prevalentes encontrados en el ambiente. Al respecto, Mullarky *et al* (129) demostraron que el genotipo más común de aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* fue también el genotipo contra el cual los neutrófilos bovinos fueron menos eficientes. En contraste, los neutrófilos fueron altamente efectivos contra los genotipos encontrados raramente en la población bajo estudio. Por lo tanto, se podría sugerir que los genotipos A/I y A11/VI de *S. aureus* tendrían características únicas que les posibilitaría resistir a los mecanismos de defensa del huésped. Si hay algún/os factor/es de virulencia asociado/s a las cepas A/I y A11/VI involucrado/s en evitar la respuesta inmune es desconocido y merece ser investigado en profundidad.

Interesantemente, el estudio con la población de aislamientos de *S. aureus* obtenidos dentro de un período de 8 años reveló un pico de prevalencia del genotipo A/I seguido por un descenso marcado en el predominio de esas cepas junto con un simultáneo aumento en la prevalencia del genotipo A11/VI. La variabilidad genética entre los aislamientos identificados como tipo A o subtipo A11 se estableció por una diferencia de 4 bandas en los patrones de MECP. De acuerdo a los criterios de Tenover *et al* (204), los aislamientos pertenecientes a estos genotipos estarían posiblemente

relacionados y podrían haber derivado uno del otro después de dos eventos genéticos. La disminución en el predominio de las cepas A/I y el concomitante incremento en la prevalencia de las cepas A11/VI ocurrió en sitios distantes simultáneamente. Puede especularse que el cambio en los tipos prevalentes podría haberse debido al uso de antibióticos, un factor de presión selectiva sobre la población bacteriana, en los bovinos enfermos (224). Existe evidencia previa que demostró que un número limitado de clones podría estar asociado con la expresión de la resistencia a la meticilina (102), una característica que puede ser segregada bajo presión selectiva aplicada artificialmente. En Argentina, el 64% de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis fueron resistentes a un antibiótico de uso corriente, como mínimo (57). No se dispone de información que demuestre si hubo un cambio en el patrón de resistencia a los antibióticos en los aislamientos de *S. aureus* estudiados dentro del período 1989-1996.

El análisis de los patrones de bandas de ADN plasmídico digerido con una endonucleasa (REAP) fue descrito para investigar brotes epidémicos de *S. aureus* (232). Aunque la relativa estabilidad de los plásmidos estafilocócicos fue debatida con frecuencia, el método ha sido utilizado extensamente (200). Ciertamente, el análisis de los perfiles de REAP fue útil para resolver problemas epidemiológicos cuando las cepas en estudio presentaron genotipos idénticos por alguna otra técnica de tipificación (2, 3). En este estudio, el método fue utilizado para investigar aislamientos obtenidos dentro de un período máximo de cinco meses. A fin de evitar diferencias atribuibles a la inestabilidad plasmídica, no se comparó ningún aislamiento obtenido fuera de este lapso de tiempo. La adquisición de un plásmido con un determinado tipo de REAP y selección en respuesta, por ejemplo, a la introducción de un nuevo esquema terapéutico entre los bovinos enfermos es un proceso que podría tomar varios meses dentro de un área dada. De este estudio, surge que la recolección de muestras dentro de un período corto de tiempo hace al método de REAP aceptable para discriminar aislamientos que exhiben idénticos genotipos por otras técnicas. Además, el análisis del ADN plasmídico mediante REAP es económico, no requiere equipamiento sofisticado y puede ser realizado en la mayoría de los laboratorios.

El análisis de los patrones de bandas de la MECP y de la ribotipificación automatizada podrían ser métodos apropiados para estudiar la relación genealógica de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de vacas con mastitis. Teniendo en cuenta los resultados observados, ambos métodos mostraron una discriminación satisfactoria. Al respecto, el índice discriminatorio de la MECP fue mayor ($D=0,91$) que el hallado para la ribotipificación automatizada ($D=0,69$). Sin embargo, es necesario considerar que para el análisis de los resultados se utilizaron diferentes criterios de interpretación. Los criterios estrictos de Tenover *et al* (204) se aplicaron para asegurar la relación clonal entre los aislamientos estudiados por el método de MECP. La ribotipificación automatizada utiliza un programa de computación que asigna un código a cada patrón de bandas. Luego, cada perfil de bandas se compara con los otros que existen en una base de datos (28) y aquellos que son estadísticamente indistinguibles son agrupados en el mismo ribotipo. La aplicación de otro criterio para el análisis de la ribotipificación manual ha llevado en el pasado a la conclusión de que el método podría no ser del todo útil para *S. aureus* (203). Sin embargo, la ribotipificación automatizada realizada siguiendo las especificaciones del proveedor, fue tan útil como la tipificación por MECP para el propósito de este estudio. Finalmente, la elección de uno u otro método podría depender de la disponibilidad y/o costo del equipo. Una característica de la ribotipificación automatizada es que el método puede proveer información adicional respecto a la confirmación de la identificación de especies (27).

Por otro lado, el análisis de los perfiles de bandas de MECP permitió diferenciar fehacientemente los genomas de las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN6390 entre los aislamientos clínicos bovinos. De igual modo, la ribotipificación automatizada agrupó a las cepas de laboratorio en un ribotipo diferente del resto. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado y en referencia a los objetivos propuestos en el presente trabajo, sería conveniente que la cepa vacuna experimental presentara un genotipo diferente al de los genotipos prevalentes. De esta manera, la cepa vacuna podría ser inequívocamente identificada del resto de los aislamientos clínicos durante un estudio de campo, en el caso de aparición de animales enfermos entre el grupo de individuos vacunados.

4.2 Expresión de polisacárido capsular por aislamientos clínicos de *S. aureus*

Los antígenos capsulares de *S. aureus* fueron señalados como uno de los primeros blancos de estudio para el diseño de vacunas. Las bacterias capsuladas son resistentes a la fagocitosis por los leucocitos, por lo tanto, anticuerpos anticápsula protegerían al huésped al neutralizar las propiedades antifagocíticas de la cápsula bacteriana (47, 48, 97).

La gran mayoría de los aislamientos clínicos humanos de *S. aureus* producen polisacárido capsular (PC), en particular los serotipos 5 u 8 (105). Sin embargo, estudios realizados en distintos países reportaron una prevalencia variable en la expresión de los serotipos 5 u 8 entre los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus*. Tal es el caso de Francia, en donde se determinó que el PC5 fue el serotipo prevalente en los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de vacas con mastitis (162). Por otro lado, en Estados Unidos se estableció que el 41% de los aislamientos expresaron PC5 u PC8 (65, 133). Mientras tanto, en Europa, aproximadamente el 70% de las cepas reaccionaron con los anticuerpos específicos dirigidos hacia PC5 y PC8 (66).

Para el diseño racional de una vacuna para la prevención de la mastitis bovina por *S. aureus* es fundamental contar con la información acerca de la prevalencia de cepas capsuladas y su serotipo en nuestro país. Sorprendentemente, los resultados de este estudio mostraron una muy baja prevalencia de aislamientos bovinos de *S. aureus* que expresaron PC5 o PC8 en Argentina. Este hallazgo se asemeja a lo observado en Israel (193) y Estados Unidos (65, 208) y difirió de las prevalencias reportadas en Europa (66, 162, 208). Por otro lado, la prevalencia en Argentina de aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* con fenotipo capsular no reactivo (NR) fue notablemente alta. Una pregunta que surgió de estos resultados fue si las cepas que no expresaron los serotipos 5 y 8, portaban los genes requeridos para la expresión del PC, como ha sido demostrado para la cepa NR de *S. aureus* 8325 (21, 108, 216). Tres de las ocho cepas bovinas analizadas llevaron la información requerida para producir PC5 pero no expresaron ese tipo capsular. El fenotipo PC5 deficiente de estas cepas podría deberse a daños en el promotor principal (localizado al comienzo del operón) y/o promotores

internos que provocaría/n una disminución o una pérdida en la fuerza de expresión y como resultado no se hallarían niveles detectables del PC5 (149). Asimismo, la ausencia de expresión del PC5 en estas cepas podría deberse a mutaciones puntuales en alguno de los genes necesarios para la expresión de tal serotipo capsular (216). Recientemente, se demostró que la producción de PC5 es positivamente regulado por el regulador global *agr* de *S. aureus* (41, 161). Entonces, un defecto genético en alguno de los genes integrantes del locus regulatorio *agr* podría afectar la expresión del PC5. De comprobarse esto, las 3 cepas bovinas estudiadas podrían tener también afectada la expresión de algún/os de los factores de virulencia regulados por el sistema *agr*. Por otro lado, los restantes aislamientos seleccionados no hibridaron con ninguna de las sondas para los genes de cápsula conocidos. La probable producción de una cápsula no relacionada a los serotipos 5 u 8 en estos 5 aislamientos debería ser estudiada en mayor profundidad.

El hecho que la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche de vacas enfermas fueran no reactivas (NR) a los anticuerpos capsulares ensayados pone el duda el rol del serotipo 5 y 8 del PC en la patogenia de la infección intramamaria de los bovinos de Argentina. Recientemente, se demostró que el PC5 enmascararía las adhesinas de la pared celular inhibiéndose la adherencia de *S. aureus* a las células endoteliales, un paso crucial de la patogénesis (161). Mientras algunas investigaciones han determinado que la cápsula de *S. aureus* aumenta la virulencia bacteriana en modelos animales de letalidad, bacteriemia y artritis séptica (139, 206), otros han observado que la cápsula atenúa la virulencia estafilocócica en un modelo de endocarditis en rata (16). No hay estudios dirigidos a investigar el rol de los serotipos 5 y 8 de PC en modelos animales de mastitis. Mamo *et al* (116) establecieron que los aislamientos bovinos de *S. aureus* cultivados en suero lácteo produjeron un material capsular sensible a periodato que correlacionó con la virulencia en un modelo murino de mastitis. Sin embargo, la composición de esta sustancia capsular nunca fue reportada. Asimismo, Watson *et al* (217) determinaron que cepas de *S. aureus* crecidas en leche expresaron una "pseudocápsula" que tuvo propiedades inmunoprotectivas en vacas. De nuevo, la naturaleza química de este material nunca fue reportada. Entonces, mucho permanece por ser explicado en cuanto al rol, si hay

alguno, que juega el polisacárido capsular de *S. aureus* en la mastitis bovina. Recientemente, varios aislamientos bovinos de *S. aureus* NR reaccionaron con anticuerpos a un nuevo polisacárido de superficie estafilocócica descrito como un compuesto de poli-*N*-succinil glucosamina (PNSG) (121). Sin embargo, en el mismo trabajo se comprobó que la elaboración del PNSG fue inducida durante la infección *in vivo* y que la expresión fue reducida o perdida después del pasaje *in vitro* de las bacterias por agar tripteína de soja (121). Si en nuestro país, los aislamientos de *S. aureus* NR hallados expresan *in vivo* el nuevo antígeno capsular PNSG u otra sustancia capsular merece ser determinada.

Las vacunas para la prevención de la mastitis bovina por *S. aureus* que han alcanzado la etapa de comercialización y otras aún en el terreno experimental están basadas en bacterias muertas administradas por la ruta parenteral y contienen antígenos de polisacárido capsular como componentes claves (60, 142, 218). Probablemente, varios factores contribuyen al limitado éxito de estas vacunas, incluyendo la incorporación de antígenos capsulares irrelevantes y no representativos de los existentes en las cepas circulantes en la población blanco. Además, no está claro si una vacuna que induce una respuesta inmune sistémica será efectiva contra la infección estafilocócica confinada a la ubre. Una vacuna para la prevención de la mastitis bovina necesita una cuidadosa confección, para ello es esencial una minuciosa caracterización de las cepas prevalentes en la población blanco.

Hay ciertas características en *S. aureus*, como la resistencia a la metilina, que están mundialmente restringidas a un número limitado de clones aislados de humanos (102). Más aún, un cierto genotipo definido con un patrón de bandas de MECP fue asociado con la expresión de la enterotoxina A por *S. aureus* aislados de brotes de intoxicación alimentaria ocurridos en localidades geográficamente distantes (210). En nuestro país, el PC8 estuvo significativamente asociado con el tipo B de MECP. La interpretación de este hallazgo puede ser vista desde dos puntos de vista. Por un lado, 4 de las 8 cepas de *S. aureus* con PC8 y tipo B de MECP fueron aisladas de diferentes rebaños dentro del mismo distrito de febrero de 1990 a junio de 1994. La relación epidemiológica de los aislamientos pertenecientes a rebaños dentro de un mismo

distrito no pudo ser excluida debido a que vectores no estudiados podrían haber diseminado la cepa con genotipo B y PC8 a localidades vecinas dentro del mismo distrito en un período de 4 años. Por otro lado, los aislamientos con PC8 fueron obtenidos de rebaños alejados entre sí por 1100 Km, y varios de estos aislamientos exhibieron idéntico patrón de bandas de MECP. Una asociación epidemiológica entre los 8 aislamientos PC8-tipo B obtenidos de 5 distritos diferentes es posible pero altamente improbable. La expresión de PC8 podría estar restringida a un número limitado de clones en la región geográfica bajo estudio. La presencia de estos clones en distritos distantes de Argentina podría indicar un cercano origen genealógico de las cepas involucradas, aunque ellas podrían no tener relación epidemiológica. Otra explicación para este hallazgo es que el análisis de los patrones de MECP podría no ser un procedimiento lo suficientemente discriminativo genealógicamente para identificar estos clones que expresan PC8.

Aún cuando el 57% de los aislamientos PC5 fueron tipo A de MECP, la asociación de PC5 con este subtipo parece ser un evento al azar. Probablemente el análisis por otros métodos moleculares adicionales podrían descubrir diferencias genealógicas entre aislamientos de *S. aureus* PC5 positivos epidemiológicamente no relacionados. Esta parte del estudio estableció que en Argentina la prevalencia de los serotipos 5 y 8 de PC es muy baja (14%) en la población estudiada de aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus*. Estos datos sugerirían que los antígenos capsulares tipo 5 y 8 podrían no ser buenos candidatos como componentes esenciales de una vacuna para la prevención de la mastitis bovina en la Argentina.

Las cepas de laboratorio utilizadas en este trabajo pertenecen al linaje de la cepa patrón de *S. aureus* 8325 (143). La cepa 8325-4 fue originada por el curado con UV de los profagos phi-11, phi-12 y phi-13 presentes en la cepa 8325 (144). Más aún, luego de aplicar mutagénesis química a la cepa 8325-4 se aisló la cepa RN4220, utilizada como intermediaria en la transferencia genética (101). Por otro lado, la cepa de *S. aureus* RN6390 deriva de la cepa 8325-4 (Tabla 1) y es considerada una cepa virulenta porque mantiene su patrón hemolítico (144). Según lo establecido por Tenover *et al* (204), la diferencia de 3 bandas entre los perfiles de MECP que se observó para las

cepas 8325-4 y RN6390 (Figura 6) confirmaría la estrecha relación clonal entre ambas cepas de *S. aureus*. Wann *et al* (216) demostraron que las cepas de *S. aureus* 8325-4 y RN4220 tienen una copia intacta del grupo de genes *cap5*, pero una mutación en *cap5E* provoca la ausencia de expresión del serotipo capsular. Esto sugeriría que la cepa RN6390 (PC5) podría presentar el mismo defecto genético presente en la cepa 8325-4. Considerando lo expuesto se estableció que la cepa de *S. aureus* RN6390 era una buena candidata para obtener mutantes auxótrofas derivadas de ella en virtud de: i) el conocimiento que se tiene de su base genética (linaje 8325); ii) la virulencia observada en modelos animales; iii) la ausencia de expresión del serotipo capsular 5; y iv) un patrón de bandas de MECP diferente del resto de los aislamientos clínicos bovinos estudiados.

4.3 Aislamiento y caracterización de una mutante auxótrofa de *S. aureus*

Basados en los conocimientos actuales sobre la patogénesis de las infecciones por *S. aureus*, aún no se ha podido establecer con certeza que antígeno o combinación de ellos es capaz de proveer la mejor protección contra esta bacteria. Además, hay que tener en cuenta la compleja regulación de los factores de virulencia que intervienen en la patogénesis de las diferentes infecciones (71, 122, 145). Por este motivo, la conservación de la mayor cantidad de antígenos bacterianos en la composición de una vacuna podría ser fundamental para promover una respuesta inmune del huésped favorable contra las infecciones por *S. aureus*. Al respecto, las cepas vivas atenuadas podrían ser buenos inmunógenos ya que presentarían los antígenos en su conformación nativa. Más aún, debido a crecimiento limitado en el huésped podrían expresar antígenos que sólo son sintetizados *in vivo* (110).

En diversos estudios de principios de los años 80, se aislaron mutantes auxótrofas de *S. aureus* por inserción del transposón Tn551 (114, 118, 154, 183). La finalidad de estos trabajos fue analizar regiones cromosomales de *S. aureus* utilizando como marcador genético la resistencia a la eritromicina (Em^R) del transposón. Por otro lado, a partir del trabajo de Hoisseth *et al* (77) en donde se describe el uso del transposón Tn10 para producir una mutante de *Salmonella typhimurium* con fenotipo

aroA, que fue estable, atenuada y protectora, se profundizó el estudio en este tipo de estrategia para obtener vacunas vivas efectivas. Mediante distintas metodologías se han aislado y construido una variedad importante de mutantes *aro* pertenecientes a diferentes especies bacterianas (9, 23, 76, 77, 79, 84, 112, 141, 150, 175, 188, 213, 214). Sin embargo, no se han descrito mutantes *aro* de *S. aureus* para ser utilizadas como vacunas. En el presente trabajo se utilizó la mutagénesis por inserción del transposón Tn917 a fin de aislar mutantes auxótrofas de *S. aureus* con fenotipo *aro* deficiente.

La mutagénesis por transposición ha posibilitado el aislamiento y construcción de mutantes bien definidas y ha sido utilizada exitosamente en el estudio de diversas bacterias patógenas. El transposón Tn917 ha sido exitosamente utilizado en diferentes bacterias Gram-positivas (212, 229). En el presente trabajo, se aislaron mutantes auxótrofas por medio de la inserción de Tn917 en el genoma de la cepa de *S. aureus* RN6390. El fenotipo auxótrofo observado en las diferentes mutantes aisladas se debió a una única inserción al azar del Tn917, tal como se comprobó por análisis de hibridación. En trabajos previos se establecieron similares resultados en cuanto a la caracterización de las inserciones (únicas y al azar) en el genoma de distintas mutantes estafilocócicas obtenidas por transposición (36, 115). El transposón Tn917 genera una duplicación de 5 pb en la secuencia blanco donde se inserta (156) y exhibe una muy baja frecuencia de escisión precisa (180, 212, 228). Al respecto, la frecuencia de reversión determinada para la mutante Sa306 fue menor a 5×10^{-13} lo que sugeriría que es muy poco probable que Sa306 revierta al fenotipo salvaje.

Las mutantes *aro* son auxótrofas para los aminoácidos aromáticos (Trp, Phe y Tyr), el ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (un precursor del ácido fólico) y/o el ácido 2,3-dehidrobenzóico (DHB) (un precursor de la enterocolina que une hierro) (160). En el presente trabajo, las mutantes auxótrofas aisladas presentaron diferentes requerimientos nutricionales para su crecimiento en medio definido mínimo (MDM). Cersini *et al* (34) describieron los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento *in vitro* de mutantes auxótrofas de *Shigella flexneri*. Los autores sugirieron que las mutantes de *S. flexneri aroB* (3-dehidroquinato sintetasa) necesitarían los

aminoácidos aromáticos y PABA. Las mutantes *aroC* (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa) requerirían arginina, alanina, histidina, Trp, Phe, Tyr, PABA, DHB y ácido nicotínico; mientras que las mutantes *aroD* (dehidroquinato deshidratasa) necesitarían los aminoácidos aromáticos, PABA, DHB y ácido nicotínico. Por lo tanto, la ausencia total de crecimiento de la mutante *Sa306* en placas de MDM carentes de Trp, Phe, Tyr, PABA y DHB permitiría sugerir que la enzima afectada y responsable del fenotipo observado sería alguna de las que llevan a la formación del ácido shiquímico y/o ácido corísmico (Apéndice II).

Por otro lado, el crecimiento diferencial de la mutante *Sa306* observado en placas de MDM suplementadas con distintas combinaciones de los aminoácidos aromáticos, PABA y/o DHB al cabo de 7 días de incubación, podría sugerir que otros metabolitos podrían suplir la deficiencia nutricional de *Sa306* cultivada bajo esas condiciones. Otra posible explicación a este hecho podría ser que bajo las condiciones *in vitro* ensayadas, ciertos metabolitos podrían ser convertidos químicamente sin necesidad de reacción enzimática alguna. Al respecto, el ácido 3,7-dideoxi-D-treo-hepto-2,6-diulosónico puede ser convertido químicamente a ácido 3-dehidroquinico sin ningún tipo de reacción enzimática (7). Más aún, las observaciones realizadas *in vitro* por Bentley (20) indican que el ácido shiquímico podría sustituir a los aminoácidos aromáticos ayudando al crecimiento de las mutantes auxótrofas. Por otro lado, la estabilidad del fenotipo Aro-deficiente de la mutante *Sa306* fue estable al cabo de 25 repiques sucesivos *in vitro*, así como luego del pasaje *in vivo* sugiriendo que el fenotipo observado podría deberse a un cambio genético y no a una adaptación fisiológica.

Una estrategia para poder conocer la secuencia de un gen desconocido en el que se encuentra insertado un transposón, es realizar una reacción de PCR inversa y posteriormente secuenciar el fragmento amplificado. La técnica de PCR inversa se basa en la circularización de fragmentos de digestión de ADN cromosomal (secuencia desconocida flanqueada por pequeñas porciones de secuencias conocidas) que serán usados como plantillas en una posterior amplificación con cebadores divergentes y complementarios al extremo 5' de las secuencias conocidas (209). Siguiendo esta metodología, se obtuvo un fragmento de ADN apropiado para ser secuenciado y poder

así determinar el gen en donde se habría insertado el Tn917. El análisis de la secuencia nucleotídica incógnita (253 pb) reveló un 94% de homología con el gen *aroA* de *S. aureus* (147) y un 49% de homología con el gen *aroA* de *Bacillus subtilis* (72). Asimismo, la secuencia aminoacídica (84 aa) deducida de la traducción de las 253 pb fue 79% idéntica a la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) de *S. aureus*, codificada por el gen *aroA*. Más aún, la alineación con la secuencia aminoacídica de la EPSPS de *B. subtilis* presentó una considerable homología con la secuencia incógnita. Varias líneas de evidencia sugieren que el gen *aroA* de *S. aureus* es parte de un operon, el cual incluye también a los genes *aroB* y *aroC* (80, 155). La organización de los genes *aro* en *S. aureus* es diferente de la que presenta *B. subtilis*, donde el gen *aroA* es parte de un superoperon de 13 genes involucrados en la biosíntesis y transporte de los aminoácidos aromáticos (73). Mediante el análisis de los tamaños esperados y obtenidos correspondientes al fragmento de ADN estudiado, se podría sugerir que el transposón Tn917 podría estar insertado entre los nucleótidos 830-850 del gen *aroA* de *S. aureus*. Por otro lado, la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa interactuaría con el ácido fosfoenolpirúvico sólo cuando está acomplejada con el ácido shiquímico-3-fosfórico dando lugar al ácido 5-enolpiruvilshiquímico-3-fosfórico (160).

El grado de patogenicidad de una cepa dada puede ser medido en términos de dosis letal 50 (DL₅₀), siempre que se cuente con un modelo de infección sistémica. Es sabido que los humanos y animales sanos tienen un alto grado de resistencia innata a las infecciones invasivas por estafilococos (109). Por ello, el modelo letal utilizado en este trabajo consistió en inocular por vía ip las bacterias suspendidas junto con una levadura inócua. De esta manera, los fagocitos atacarían en su mayor parte a las levaduras y un número importante de bacterias podrían escapar a este ataque y causar la infección letal. Además hay que tener en cuenta que en nuestro caso se utilizaron cepa no capsuladas de *S. aureus*, las que podrían ser fácilmente fagocitadas por los neutrófilos y macrófagos de la cavidad peritoneal. Por otro lado, es un hecho ampliamente conocido que la capacidad antibacteriana de la cavidad peritoneal es relativamente pobre (126). En el presente trabajo se determinó que la mutante Sa306 fue atenuada respecto de la cepa parental, debido a que se requirió una DL₅₀ 16 veces

mayor para ocasionar la muerte del 50% de los animales infectados. Cuando las bacterias se inocularon por vía iv, no se establecieron diferencias en las DL₅₀ de la mutante Sa306 y de la cepa RN6390. Posiblemente, esto podría deberse a la importancia de los factores del suero y a que la fagocitosis es más eficiente en la vasculatura que en la cavidad peritoneal. En general, cuando se inoculan bacterias capsuladas por vía iv se necesitan alrededor de 10⁵ UFC para causar la muerte de los animales. Por el contrario, unas pocas bacterias inyectadas intraperitonealmente podrían ser letales (126). Los resultados observados permitirían plantear que la atenuación de la mutante Sa306 podría deberse a la inserción del Tn917 en el gen *aroA*. Interesantemente, la atenuación de las mutantes *aro* y especialmente las mutantes *aroA* podrían tener consecuencias en el campo de la terapia antimicrobiana. Un efecto sobre la virulencia similar al descrito para la mutante *aroA* podría ser obtenido con un inhibidor específico de la 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa (codificada por *aroA*), como el carbafofonato y sus derivados (174).

Por otro lado, los datos histológicos establecieron que las anormalidades patológicas observadas en los preparados correspondientes a los animales infectados con la mutante Sa306 fueron menos severas en comparación a las halladas cuando los ratones se infectaron con la cepa parental virulenta RN6390. Yao *et al* (226) establecieron en un modelo murino de bacteriemia, que luego de producida la infección por *S. aureus* pudieron determinarse anormalidades patológicas y citoquinas inflamatorias luego de la depuración bacteriana. Considerando lo expuesto, las deficiencias metabólicas de la mutante Sa306 limitarían su replicación en los tejidos y por lo tanto no contribuiría al aumento del daño tisular. De igual modo, la moderada migración de LPMN al sitio de infección inducida por la mutante Sa306 podría no ser suficiente como para promover un daño tisular mayor, producto del estallido respiratorio de los neutrófilos. Al respecto, los resultados obtenidos indicarían una baja capacidad de la mutante *aroA* para causar daño en el huésped, lo que confirmaría la atenuación de Sa306.

Los estudios de permanencia demostraron que la mutante Sa306 creció pobremente *in vivo*. El defecto genético en el gen *aroA* no afectaría la velocidad de

crecimiento de la mutante *Sa306* debido a que no se establecieron diferencias *in vitro* respecto de la cepa parental RN6390. Por el contrario, mutantes *aroA* de *Salmonella typhimurium* inoculadas por vía iv pueden persistir por varias semanas en los tejidos de los animales infectados (146). Sin embargo, respecto a la persistencia *in vivo* parecería ser excepcional lo observado con las mutantes *aroA* de *S. typhimurium* dado que *Bordetella pertussis* (175), *Aeromonas salmonicida* (213), *Pasteurella multocida* (79) y *Yersinia enterocolitica* (23) fueron rápidamente depuradas de diferentes tejidos de animales infectados experimentalmente.

A pesar de que la mutante *Sa306* permaneció poco tiempo en los tejidos podría aún producir factores de virulencia. Más aún, la atenuación de la mutante *Sa306* podría ser causa de la depleción *in vivo* de metabolitos esenciales como PABA, más que efectos indirectos sobre la expresión de los factores de virulencia. Tal suposición está basada en el hecho de que la mutante *Sa306* fue protectora cuando se la utilizó como inmunógeno antes del desafío de ratones por vía ip o ima con cepas virulentas (RN6390 o MB319). Entonces, antígenos protectivos importantes serían expresados cuando esta mutante *aroA* crece *in vivo*. El haber inducido inmunidad protectora con una mutante que presentó una permanencia limitada *in vivo* representaría un hecho ventajoso, ya que una prolongada supervivencia de la bacteria en los tejidos del huésped podría tener un efecto no deseado.

Un punto importante para tener en cuenta en los estudios de vacunación con bacterias vivas de *S. aureus*, es el motivo de elección de una ruta de inmunización local. Ciertamente, la gran mayoría de las infecciones son causadas por microorganismos que se adquieren a través de las mucosas. Por lo tanto, es especialmente importante considerar como estrategia de vacunación a la inmunidad provista por las mucosas, debido a la respuesta inmune producida en el sitio de deposición del antígeno, así como en sitios mucosos remotos (78). Es sorprendente que a pesar del nivel actual de conocimiento sobre el sistema inmune común de mucosas, las vacunas contra *S. aureus* que otros investigadores han ensayado en los últimos años han sido administradas por ruta parenteral (53). Aún cuando se conoce que la inmunización sistémica es esencialmente inefectiva para la inducción de respuestas inmunes de mucosas. En el presente trabajo se

estableció que las inmunizaciones en la glándula mamaria murina con la mutante *Sa306* confirieron protección local a través de la significativa disminución en el grado de colonización del tejido mamario de la cepa parental virulenta. Similares resultados se observaron cuando los ratones inmunizados con *Sa306* se desafiaron por ruta ima con una cepa virulenta de *S. aureus* aislada de leche de un bovino con mastitis. Probablemente, la inmunización en la glándula mamaria bovina con una mutante *araA* de *S. aureus* podría conferir protección frente a la infección por una cepa de *S. aureus* cuyo genotipo (A/I) sería el responsable de la mayoría de los casos de mastitis del ganado vacuno de nuestro país en el período de estudio.

4.4 Identificación de la mutante auxótrofa *Sa306* de los aislamientos clínicos de *S. aureus*

La identificación inequívoca de las cepas vacuna de los aislamientos clínicos es necesaria antes de considerar el uso de vacunas prototípicas en pruebas de campo. Ciertamente, la base genética de la cepa vacuna tiene que ser fácilmente reconocida de aquellas de los aislamientos clínicos bovino para asegurar si la aparición de nuevos casos de infección son causados por posibles derivados de la cepa vacuna. Teniendo en cuenta que en el diseño de la futura vacuna debiera evitarse la incorporación de genes de resistencia antibiotica en el genoma de la cepa *araA* atenuada, fue necesario considerar una estrategia para una discriminación fehaciente de la cepa vacuna.

El análisis de los perfiles de bandas de MECP permitió identificar con certeza a la mutante *Sa306* y su cepa parental, de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus*. Similarmente, las cepas de laboratorio pudieron por medio de la la ribotipificación automatizada ser discriminadas del resto de *S. aureus* aislados de leche procedente de bovinos mastíticos. Por lo tanto, los métodos moleculares de tipificación descritos en el presente trabajo podrían ser útiles para analizar una cepa vacuna de la región bajo estudio. De acuerdo a lo sugerido por Fitzgerald *et al* (49) la existencia de tan sólo 2 genotipos (A/I y A11/VI) prevalentes entre los aislamientos bovinos de *S. aureus* podría representar una tasa de flujo genético lento en la población natural de *S. aureus* en estudio. Consecuentemente, los resultados de este trabajo podrían permanecer válidos

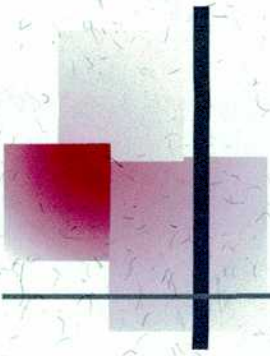
y ser útiles por varios años. Entonces, podría no ser necesario repetir un estudio similar antes de cada prueba de campo usando vacunas vivas atenuadas construidas sobre la misma base genética y dentro de la misma área geográfica.

La importancia de este estudio radica en el hecho de que provee información acerca de un posible procedimiento para ser llevado a cabo antes de que una cepa vacuna de *S. aureus* sea introducida en el ambiente. Una de las mayores preocupaciones cuando una vacuna viva atenuada es utilizada, refiere a la posibilidad de aparición de casos nuevos de enfermedad causados probablemente por revertantes de la misma. La aparición de vacas con mastitis en los rebaños vacunados no debería ser descartada porque no puede asumirse el ciento por ciento de protección contra la infección. Ciertamente, la eficacia de la vacunación con una cepa viva atenuada de *S. aureus* para prevenir la mastitis bovina tiene que ser determinada en pruebas de campo. El procedimiento descrito en este trabajo puede ser seguramente utilizado para asegurar la estabilidad de las cepas vacuna en bovinos, al igual que podría proveer información sobre la diseminación de un derivado de la cepa vacuna si este evento ocurriera en la naturaleza.

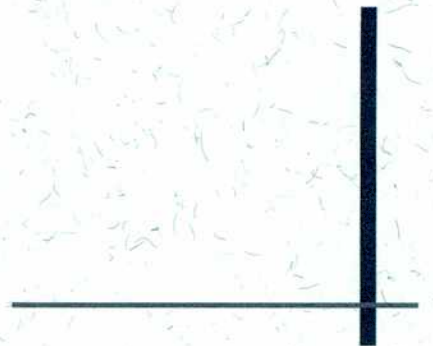
4.5 Consideraciones futuras

La utilización como vacuna de un patógeno bacteriano vivo racionalmente atenuado, representa un medio de vacunación atractivo, relativamente seguro, barato, de duración prolongada y eficaz, particularmente dentro del contexto veterinario. En base de los resultados observados en el presente trabajo, en un futuro debería considerarse la construcción de una cepa vacuna con una delección en el gen *aroA* introducida por mutagénesis dirigida. De este modo, se evitaría introducir genes de resistencia antibiótica como ocurre con la mutagénesis insercional. Otra posibilidad, sería construir mutantes que presenten mutaciones en dos genes diferentes de la vía de los aminoácidos aromáticos. De esta manera se podrían generar mutantes auxótrofas con un crecimiento limitado más controlado, sin posibilidades de utilización de otros metabolitos para suplir las deficiencias metabólicas ocasionadas por una única mutación. Por otro lado, también debería considerarse, que la cepa vacuna tendría que

poseer todos los determinantes antigénicos necesarios para proteger contra las infecciones ocasionadas por los genotipos prevalentes en el momento y región en estudio; pero debería ser fehacientemente identificada. Por lo tanto, la futura cepa vacuna debería ser inócua, estable, identificable y lo suficientemente inmunogénica como para conferir protección contra la infección por *S. aureus*.



Conclusiones



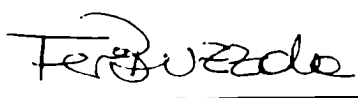
En el presente trabajo se llevaron a cabo estudios tendientes al diseño de una potencial vacuna viva atenuada. En una primera etapa se consideró la relación clonal y la prevalencia del serotipo capsular de aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis. En una etapa posterior se aisló una mutante auxótrofa de *S. aureus* y se evaluó su atenuación, persistencia e inmunogenicidad. Los resultados descriptos permitieron concluir:

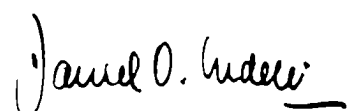
1. El 85,5% de los aislamientos clínicos bovinos analizados por MECP integraron un único grupo clonal (grupo 1) en el que compartieron el 80% de similitud genómica. El denominado tipo A de MECP fue el más prevalente.
2. La ribotipificación automatizada discriminó a los aislamientos clínicos bovinos en 13 ribotipos, siendo más prevalentes el ribotipo I y el VI.
3. Entre los aislamientos clínicos bovinos estudiados se determinaron dos genotipos, A/I y A11/VI, que se hallaron extensamente distribuidos en el país y cuya prevalencia fluctuó en el tiempo.
4. La MECP y la ribotipificación automatizada concordaron en la identificación de los dos genotipos mayoritarios (A/I y A11/VI) de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* estudiados.
5. Mediante el análisis de los patrones de REAP se logró una mejor diferenciación de los aislamientos con idéntico genotipo por MECP y ribotipo.
6. La mayoría (86,3%) de los aislamientos clínicos bovinos presentaron fenotipo capsular NR. La prevalencia de los serotipos 5 y 8 de PC fue menor al 10%, en ambos casos.
7. Los serotipos 5 y 8 de PC no serían buenos candidatos para formar parte de una vacuna que prevenga la mastitis bovina en Argentina.

8. En el período estudiado, el tipo B de MECP se encontró asociado a la expresión de PC8. Por el contrario, el tipo A de MECP no se observó asociado a la expresión del PC5 ni al fenotipo capsular NR.
9. Los aislamientos clínicos bovinos con PC5 o PC8 estuvieron desigualmente distribuidos en el tiempo de estudio.
10. Mediante mutagénesis por transposición, se obtuvo una mutante auxótrofa de *S. aureus*, denominada Sa306, con fenotipo dependiente de los aminoácidos aromáticos para su crecimiento.
11. El fenotipo Aro-deficiente de la mutante Sa306 demostró ser estable *in vitro* e *in vivo*. La frecuencia de reversión de Sa306 fue $<5 \times 10^{-13}$.
12. El fenotipo Aro-deficiente de la mutante Sa306 se debió a una única inserción del transposón Tn917 en el gen de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa, por lo tanto sería una mutante *aroA*.
13. La mutante Sa306 mostró un importante grado de atenuación respecto de la cepa parental en dos modelos murinos de infección sistémica. La DL₅₀ de Sa306 fue 16 veces superior a la DL₅₀ de la cepa parental virulenta. Además, se determinó una significativa supervivencia de los animales inoculados con la mutante Sa306 respecto a los infectados con la cepa parental.
14. La evaluación histológica reveló que las anormalidades histopatológicas fueron menos severas en los animales infectados con la mutante Sa306.
15. La mutante Sa306 mostró una capacidad disminuida para proliferar en los tejidos murinos estudiados.
16. La mutante Sa306 demostró su inmunogenicidad al conferir una significativa protección sistémica frente al desafío con la cepa parental virulenta RN6390.

17. La inmunización de la glándula mamaria con la mutante *Sa306* indujo la protección local al provocar una disminución en el grado de colonización de la mama por la cepa parental virulenta de *S. aureus* RN6390.
18. La inmunización de la glándula mamaria con la mutante *Sa306* confirió protección local al ocasionar de manera indirecta una disminución en la colonización del tejido mamario por una cepa de *S. aureus* (genotipo A/I y fenotipo capsular NR) aislada de leche de un bovino con mastitis.
19. La mutante *Sa306* y su cepa parental fueron discriminadas e identificadas inequívocamente entre los aislamientos clínicos bovinos por los métodos moleculares de tipificación estudiados.

Los hallazgos presentados en este estudio son promisorios respecto al desarrollo de métodos inmunioprolácticos para la prevención de la mastitis bovina. El diseño de los mismos debería considerar el genotipo mayoritario asociado a la enfermedad con el fin de lograr protección frente a la infección con cepas de *S. aureus* que presenten dicho genotipo. Además, la inclusión de los serotipos 5 u 8 de PC podría no tener relevancia en la formulación de una vacuna para uso local. Asimismo, el aislamiento de una mutante de *S. aureus* *araA* inócua, atenuada e inmunogénica, hace factible el potencial uso de esta estrategia en el diseño de vacunas vivas. Es importante hacer notar que son varios los factores que influyen en el desarrollo de una infección: el huésped, la respuesta inmune, el ambiente y el patógeno. El establecimiento de métodos para impedir el desarrollo de la mastitis por *S. aureus* requiere, entonces, un estudio de las características de la población bacteriana presente en los bovinos enfermos, un profundo conocimiento de la interacción primaria entre el patógeno y el huésped como así también un amplio conocimiento de la respuesta inmune. Será así necesario contar con una vasta información acerca de la patogénesis de la infección de la glándula mamaria por *S. aureus* para encarar en forma definitiva un procedimiento inmunioproláctico efectivo para prevenir la mastitis bovina por *S. aureus*.







Resumen



La mastitis es una enfermedad infecciosa que aqueja al ganado bovino lechero afectando la producción y la calidad de la leche. En nuestro país y en el mundo, el principal agente etiológico de la mastitis bovina es la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*. La infección de la glándula mamaria de las vacas en ordeño continúa siendo un grave problema para los productores debido a las importantes pérdidas económicas que ocasiona en la industria lechera. Además, implica serias dificultades sanitarias y epidemiológicas, por la presencia de cepas toxigénicas y el posible contenido en la leche de residuos de antibióticos. Una estrategia para disminuir el impacto de la mastitis en el ganado bovino es inducir la inmunidad de los animales para resistir a la infección por *S. aureus*.

En este trabajo de investigación se puso especial énfasis en el aislamiento, caracterización e identificación clonal de una mutante auxótrofa de *S. aureus* para la aplicación al desarrollo de vacunas. Los requerimientos de estabilidad, inocuidad, inmunogenicidad e identificación de la mutante auxótrofa entre la población de aislamientos clínicos bovinos fueron los principales objetivos del estudio. Inicialmente, se evaluó la relación clonal y la prevalencia del serotipo capsular de los aislamientos de *S. aureus* procedentes de leche de bovinos con mastitis. Al respecto, se estableció que el 85,5% de los aislamientos clínicos bovinos analizados por macrorrestricción genómica y separación de los fragmentos por electroforesis en campos pulsados (MECP) fueron identificados como tipo A o sus subtipos (grupo 1). Además, los aislamientos pertenecientes al grupo 1 compartieron el 80% de similitud genómica siendo el denominado tipo A de MECP el más prevalente. Por otro lado, la ribotipificación automatizada discriminó a los aislamientos clínicos bovinos en 13 ribotipos, siendo mayoritarios los ribotipos I y VI. El análisis conjunto de los resultados obtenidos con ambos métodos de tipificación permitió identificar entre los aislamientos clínicos bovinos estudiados dos genotipos (A/I y A11/VI) cuya prevalencia fluctuó en el tiempo y que además, se hallaron extensamente distribuidos en el país.

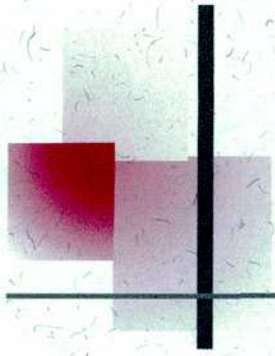
Sorprendentemente, el 86,3% de los aislamientos clínicos bovinos de *S. aureus* presentaron fenotipo capsular no reactivo (NR) frente a los anticuerpos específicos dirigidos contra los serotipos capsulares 5 (PC5) y 8 (PC8). La prevalencia de PC5 y

PC8 fue menor al 10%, en ambos casos. Por lo tanto, los serotipos 5 y 8 de PC no serían buenos candidatos para formar parte de una vacuna que prevenga la mastitis bovina en Argentina. Por otro lado, el tipo B de MECP se encontró asociado a la expresión de PC8 en el período estudiado. Por el contrario, el prevalente tipo A de MECP no se observó asociado al fenotipo capsular NR ni a la expresión del PC5 u PC8.

En la segunda fase del trabajo, se aisló una mutante auxótrofa de *S. aureus* cuyo fenotipo fue dependiente para el crecimiento de los aminoácidos aromáticos. Esta mutante Aro-deficiente se denominó *Sa306* y se obtuvo mediante mutagénesis por inserción del transposón Tn917 en el genoma de la cepa virulenta RN6390 de *S. aureus*. El fenotipo observado en la mutante *Sa306* se debió a una única inserción del transposón Tn917 en el gen de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetasa, por lo tanto sería una mutante *aroA*. La mutante *Sa306* demostró ser estable *in vitro* e *in vivo*. La frecuencia de reversión de *Sa306* fue $<5 \times 10^{-13}$.

Asimismo, la mutante *Sa306* mostró un importante grado de atenuación respecto de la cepa parental en dos modelos murinos de infección sistémica. Al respecto, la DL_{50} de la cepa parental RN6390 ($6,3 \times 10^4$ UFC/ml) fue dos órdenes menor que la DL_{50} observada con la mutante *Sa306* (1×10^6 UFC/ml). Además, la mutante *Sa306* mostró cierta incapacidad para proliferar en los tejidos murinos estudiados. La capacidad inmunogénica de la mutante *Sa306* fue demostrada al conferir una significativa protección sistémica (Porcentaje de protección: Controles: 0% vs Inmunizados: 52%, $p < 0,01$) frente al desafío con la cepa parental virulenta RN6390. De igual modo, la mutante *Sa306* protegió localmente la glándula mamaria al provocar indirectamente una disminución significativa en el grado de colonización de la mama por la cepa parental virulenta RN6390 (Controles: 1088 UFC totales vs Inmunizados: 130 UFC totales, $p < 0,01$) y por la cepa virulenta de *S. aureus* MB319 aislada de leche de una vaca con mastitis (Controles: 120 UFC totales vs Inmunizados: 30 UFC totales, $p = 0,0047$). Ciertamente, la mutante auxótrofa *Sa306* fue inmunogénica ya que la inmunización local disminuyó significativamente la colonización de la glándula mamaria por las cepas virulentas de *S. aureus* homóloga (RN6390) y por una cepa heteróloga con genotipo A/I (MB319).

Por otro lado, la mutante *Sa306* y su cepa parental fueron discriminadas e identificadas inequívocamente entre los aislamientos clínicos bovinos por los métodos moleculares de tipificación (MECP y ribotipificación) estudiados. Los hallazgos presentados en este trabajo son promisorios respecto a la factibilidad de utilizar como método inmunoproláctico una mutante *aroA* atenuada de *S. aureus* para la prevención de la mastitis bovina. El diseño del mismo debería considerar los genotipos prevalentes asociados a la enfermedad a fin de que la cepa vacuna confiera protección frente a ellos. Además, no debería incluir los serotipos 5 u 8 de polisacárido capsular dado que existen en muy bajo porcentaje dentro de la población de *S. aureus* bajo escrutinio. Ciertamente, una mutante *aroA* atenuada e inmunogénica hace factible el potencial uso de ésta estrategia en el diseño de vacunas vivas para prevenir algunas de las infecciones ocasionadas por *S. aureus*.



Referencias



1. Aarestrup F, Scott N y Sordillo L. Ability of *Staphylococcus aureus* to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. *Infect Immun* (1994), 62, p5679-5682.
2. Aarestrup F, Dangler C y Sordillo L. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Can J Vet Res* (1995), 59, p124-128.
3. Aarestrup F, Wegener H y Rosdahl V. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet Microbiol* (1995), 45, p139-150.
4. Aarestrup F, Wegener H, Jensen N, Jonsson O, Myllys V, Thorberg B, Waage S y Thamdrup Rosdahl V. A study of phage and ribotype patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Nordic countries. *Acta vet Scand* (1997), 38, p243-252.
5. Abdelinour A, Arvidson S, Bremell T, Ryden C y Tarkowski A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. *Infect Immun* (1993), 61, p3879-3885.
6. Adlam C, Kerry J, Edkins S y Ward P. Local and systemic antibody responses in cows following immunization with staphylococcal antigens in the dry period. *J Comp Pathol* (1981), 91, p105-108.
7. Adlersberg M y Sprinson D. Synthesis of 3,7-dideoxy-D-threo-hepto-2,6-diulosonic acid: a study in 5-dehydroquinic acid formation. *Biochemistry* (1964), 3, p1855-1860.
8. Ahmed Z, Sarker M y Sack D. Protection of adult rabbits and monkeys from lethal shigellosis by oral immunization with a thymine-requiring and temperature-sensitive mutant of *Shigella flexneri* Y. *Vaccine* (1990), 8, p153-158.
9. Alexander J, Andrew P, Jones D y Roberts I. Characterization of an aromatic amino acid-dependent *Listeria monocytogenes* mutant: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in mice. *Infect Immun* (1993), 61, p2245-2248.
10. Andrews P y Krinsky M. Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase. En: *Immunochemical techniques. Part 1: Phagocytosis and cell-mediated cytotoxicity*. *Methods Immunol* (1986), 132, p369-377.
11. Arbeit R. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P, Baron E, Pfaller M (ed), ASM Press, Washington. (1995), p190-208.

12. Arbeit R. Laboratory procedures for epidemiologic analysis. En: *The Staphylococci in human disease*. Crossley K y Archer G (ed). Churchill Livingstones, New York. (1997), p253-286.
13. Asociación Argentina de Lucha contra la Mastitis. Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina. *Com Fed Lecheria Arch Lechería* (1983), 6, p73.
14. Back N, Linnemann C y Pfaller M. Recurrent epidemics caused by a single strain of erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: the importance of molecular epidemiology. *JAMA* (1993), 270, p1329-1332.
15. Bacon G, Burrows T y Yates M. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*. *Br J Exp Pathol* (1951), 32, p85-96.
16. Baddour L, Lowrance C, Albus A, Anderson S y Lee J. *Staphylococcus aureus* microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. *J Infect Dis* (1992), 165, p749-753.
17. Barg N, Brunce C, Wheeler L, Reed G y Musser J. Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci. *Infect Immun* (1992), 60, p2636-2640.
18. Bastida-Corcvera K. The enhancement of mammary gland immunity through vaccination. En: *Bovine Medicine: diseases and husbandry of cattle*. Andrews A, Blowey R, Boyd H y Eddy R (ed) Blackwell Sci Publ, Cambridge. (1992), p335-349.
19. Bayles K, Wesson C, Liou L, Fox K, Bohach G y Trumble W. Intracellular *Staphylococcus aureus* escape the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun* (1998), p336-342.
20. Bentley R. The shikimate pathway: a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1990), 25, p307-311.
21. Bhasin N, Albus A, Michon F, Livolsi P, Park J y Lee J. Identification of a gene essential for *o*-acetylation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* (1998), 27, p9-21.
22. Birnboim H y Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* (1979), 7, p1513-1523.
23. Bowe F, O'Gaora P, Maskell D, Cafferkey M y Dougan G. Virulence, persistence, and immunogenicity of *Yersinia enterocolitica* O:8 *aroA* mutants. *Infect Immun* (1989), 57, p3234-3236.
24. Branchini M, Morthland V y Tresoldi A. Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA

- to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. *Diagn Microbiol Infect Dis* (1993), 17, p275-281.
25. Brawer R, Batista F, Burrone O, Sordelli D y Cerquetti MC. A temperature-sensitive DNA adenine methyltransferase mutant of *Salmonella typhimurium*. *Arch Microbiol* (1998), 169, p530-533.
 26. Brock J, Steel H y Reiter B. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infections by *Staphylococcus aureus* (mastitis experimental challenge). *Res Vet* (1975), 19, p152-161.
 27. Bruce J, Hubner R y Cole E. Sets of *EcoRI* fragments containing ribosomal RNA sequences are conserved among different strains of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995), 92, p5229-5233.
 28. Bruce J. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technol* (1996), 50, p77-81.
 29. Burne R y Quivey R. Use of transposons to dissect pathogenic strategies of gram-positive bacteria. *Meth Enzymol* (1994), 235, p405-427.
 30. Calzolari A, Giraudo J, Rampone H, Odierno L, Giraudo A, Frigerio C, Bettera S, Hernández J, Wehbe M, Mattea M, Ferrari M, Raspanti C, Larriestra A y Nagel R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. *J Dairy Sci* (1997), 80, p8545-862.
 31. Capuco A, Bright S, Pankey J, Wood D, Miller R y Bitman J. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J Dairy Sci* (1992), 75, p2126-2129.
 32. Casadevall A y Pirofski L. Host-pathogens interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* (1999), 67, p3703-3713.
 33. Casadevall A y Pirofski L. Host-pathogens interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* (2000), 68, p6511-6518.
 34. Cersini A, Salvia A y Bernardini M. Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect Immun* (1998), 66, p549-557.
 35. Cheung A, Coomey J, Butler C, Projan S y Fischetti V. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992), 89, p6462-6466.

36. Cheung A, Wolz C, Yeaman M y Bayer A. Insertional inactivation of a chromosomal locus that modulates expression of potential virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (1995), 177, p3220-3226.
37. Clements M y Foster S. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* (1999), 7, p458-462.
38. Corbellini C. Actualización en la patogenia y diagnóstico de las mastitis. Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis, Río Cuarto, Argentina. (1996), p37-48.
39. Coulter S, Schwan W, Ng E, Langhorne M, Ritchie H, Westbrook-Wadman S, Hufnagle W, Folger K, Bayer A y Stover K. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Molec Microbiol* (1998), 30, p393-404.
40. Dalla Pozza M, Ricci A y Vicenzoni G. Protein A gene polymorphism analysis in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res* (1999), 66, p449-453.
41. Dassy B, Hogan T, Foster T y Fournier J. Involvement of the accessory gene regulator (*agr*) in expression of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* (1993), 139, p1301-1306.
42. De Bruijn F y Rossbach S. Transposon mutagenesis. En : *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt P, Murray R, Wood W y Krieg N (ed). ASM Press, Washington. (1994), p387-405.
43. Dice L. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* (1945), 26, p297-302.
44. Dougan G, Chatfield s, Pickard D, Bester J, O'Callaghan D y Maskell D. Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different genes. *J Infect Dis* (1988), 158, p1329-1335.
45. Droke E, Paape M y Di carlo L. Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *J Dairy Sci* (1993), 76, p1035-1039.
46. Eisenstein B. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis* (1990), 161, p595-601.
47. Fattom A, Sarwar J, Ortiz A y Naso R. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. *Infect Immun* (1996), 64, p1659-1665.

48. Fatton A, Sarwar J, Basham L, Ennifar S y Naso R. Antigenic determinants of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines. *Infect Immun* (1998), 66, p4588-4592.
49. Fitzgerald J, Meaney W, Hartigan P, Smyth C y Kapur V. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect* (1997), 119, p261-269.
50. Fitzgerald J, Hartigan P, Meaney W y Smyth C. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *J Applied Microbiol* (2000), 88, p1028-1037.
51. Fontaine A, Arondel J y Sansonetti P. Construction and evaluation of live attenuated vaccine strains of *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* 1. *Res Microbiol* (1990), 141, p907-912.
52. Foster T, O'Reilly M, Phonimdaeng P, Cooney J, Patel A y Bramley A. Genetic studies of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. Properties of coagulase and gamma-toxin, alpha-toxin, beta-toxin and protein A in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. En: *Molecular biology of the Staphylococci*. Novick R (ed). VCH Publishers, New York. (1990), p403-420.
53. Foster T. Potential for vaccination against infection caused by *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* (1991), 9 p221-227.
54. Frenay H, Theelen J, Schouls L, Vandenbroucke-Grauls M, Verhoef J, van Leeuwen W Y Mooi F. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* (1994), 32, p846-847.
55. Fuller T, Thacker B y Mulks M. A riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. *Infect Immun* (1996), 64, p4659-4664.
56. García V, Gómez M, Iglesias M, Sanjuan N, Gherardi M, Cerquetti C y Sordelli D. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1996), 14, p45-51.
57. Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Reuelto M y DeGregorio O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci* (2000), 83, p1224-1227.
58. Giesecke W y van den Heever L. The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. *J Vet Res* (1974), 41, p169-212.

59. Giraudo J. Conceptos básicos sobre inmunología de la glándula mamaria y utilización de vacunas contra mastitis. Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis, Río Cuarto, Córdoba. (1996), p80-93.
60. Giraudo J, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraudo A, Bogni C, Larriestra A y Nagel R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis 1. Evaluation in heifers. *J Dairy Sci* (1997), 80, p845-453.
61. Goering R. The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application, and interpretation. En: Rapid detection of infectious agents. Specter S, Bendinelli M y Friedman H (ed). Plenum Press. (1998), p131-157.
62. Goering R. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Rev Med Microbiol* (2000), 11, p145-152.
63. Gordon L, Douglas S, Kay N, Osamu Y, Jacob H y Osserman E. Modulation of neutrophil function by lysozyme. Potential negative feedback of inflammation. *J Clin Invest* (1979), 64, p226-228.
64. Gresham H, Lowrance J, Caver T, Wilson B, Cheung A y Lindberg F. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* (2000), 164, p3713-3722.
65. Guidry A, Fatton A, Patel A y O'Brien C. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol* (1997), 59, p53-58.
66. Guidry A, Fatton A, Patel A, O'Brien C, Shepherd S y Lohuis J. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am J Vet res* (1998), 59, p1537-1539.
67. Gunel-Ozcan A, Brown K, Allen A y Maskell D. *Salmonella typhimurium aroB* mutants are attenuated in BALB/c mice. *Microb Pathog* (1997), 23, p311-316.
68. Gutierrez J, Crowley P, Brown D, Hillman J, Youngman P y Bleiweis A. Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus mutants* by using transposon Tn917: preliminary characterization of mutants displaying acid sensitivity and nutritional requirements. *J Bacteriol* (1996), 178, p4166-4170.
69. Harmon R. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci* (1994), 77, p2103-2112.
70. Hartstein A, Phelps C, Kwok R y Mulligan M. *In vivo* stability and discriminatory power of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing by restriction

- endonuclease analysis of plasmid DNA compared with those of other molecular methods. *J Clin Microbiol* (1995), 33, p2022-2027.
71. Heinrichs J, Bayer M y Cheung A. Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (1996), 178, p418-423.
 72. Henner D, Band L, Flaggs G y Chen E. The organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *hisH*, *tyrA* and *aroE* genes. *Gene* (1986), 49, p147-152.
 73. Henner D, Gollnick P y Moir A. Analysis of an 18 kilobase pair region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the *mtr* and *gerC* operons and the *aro-trp-aro* supraoperon. En: 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. Heslot H, Davies J, Florent J, Bobichon L, Durand G y Penasse L (ed). Societe Francaise de Microbiologie (1990), p657-665.
 74. Hensel M, Shea J, Gleeson C, Jones M, Dalton E y Holden D. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* (1995), 269, p400-403.
 75. Hensen S, Pavcic M, Lohuis J y Poutrel B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability in *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci* (2000), 83, p418-429.
 76. Hernanz Moral C, Flaño del Castillo E, López P, Villena A, Anguita J, Cascón A, Sánchez M, Razquín B y Naharro Carrasco G. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila* *aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infect Immun* (1998), 66, p1813-1821.
 77. Hoiseth S y Stocker B. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* (1981), 291, p238-239.
 78. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N y Svennerholm A. Mucosal immunity: implications for vaccine development. *Immunobiol* (1992), 184, p157-179.
 79. Homchampa P, Strugnell R y Adler B. Molecular analysis of the *aroA* gene of *Pasteurella multocida* and vaccine potential of constructed *aroA* mutants. *Mol Microbiol* (1992), 8, p3585-3593.
 80. Horsburgh M, Foster T, Barth P y Coggins J. Chorismate synthase from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* (1996), 142, p2943-2950.
 81. Hubner R, Cole E y Bruce J. Types of *Listeria monocytogenes* predicted by the positions of *EcoRI* cleavage sites relative to ribosomal RNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995), 92, p5234-5238.

82. Hunter P y Gaston M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* (1988), 26, p2465-2466.
83. International Dairy Federation. Bovine mastitis: definition and guidelines for diagnosis. Bulletin 2111, IDF, Bruselas, Bélgica. (1987).
84. Ivins B, Welkos S, Knudson G y Little S. Immunization against anthrax with aromatic compound-dependent (AroA⁻) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strains of *Bacillus subtilis* that produce anthrax protective antigen. *Infect Immun* (1990), 58, p303-308.
85. Jackson M, Phalen S, Lagranderie M, Ensergueix D, Chavarot P, Marchal G, McMurray D, Gicquel B y Guilhot C. Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect Immun* (1999), 67, p2867-2873.
86. Janzon L y Arvidson S. The role of the δ -hemolysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* (1990), 9, p1391-1399.
87. Jevon M, Guo C, Ma B, Mordan N, Nair S, Harris M, Henderson B, Bentley G y Meghji S. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect Immun* (1999), 67, p677-681.
88. Ji G, Beavis R y Novick R. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995), 92, p12055-12059.
89. Kalpana G, Bloom B y Jacobs W. Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in Mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991), 88, p5433-5437.
90. Kaper J, Lockman H, Balini M y Levine M. Recombinant nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. *Nature* (1984), 308, p655-658.
91. Kapur V, Sicho W, Greer R, Whittam T y Musser J. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol* (1995), 33, p376-380.
92. Karakawa W, Fournier J, Vann W, Arbeit R, Schneerson R y Robbins J. Methods for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* (1985), 22, p445-447.
93. Karakawa W y Vann W. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semin Infect Dis* (1992), 4, p285-293.

94. Keeling P, Palmer J, Donald R, Roost D, Waller R y MacFadden G. Shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* (1999), 397, p219-220.
95. Kelly A, Tiernan D, O'Sullivan C y Joyce P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows. *J Dairy Sci* (2000), 83, p300-304.
96. Kloos W y Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F y Tenover F (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington. (1999), p264-282.
97. Kojima Y, Tojo M, Goldmann D, Tosteson T y Pier G. Antibody to the capsular polysaccharide/adhesin protects rabbits against catheter-related bacteremia due to coagulase-negative *Staphylococci*. *J Infect Dis* (1990), 162, p435-441.
98. Kondalus M, Bardarov S, Russell R, Chan J, Jabobs W y Bloom B. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* (2000), 68, p2888-2898.
99. Kornblum J, Kreiswirth B, Projan S, Ross H y Novick R. *Agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. En: *Molecular biology of the Staphylococci*. Novick R (ed), VCH Publishers, New York. (1990), p373-402.
100. Kotwal G. Microorganisms and their interaction with the immune system. *J Leukoc* (1997), 62, p415-429.
101. Kreiswirth B, Lofdahl M, Betley M, O'Reilly M, Schlievert P, Bergdoll M y Novick R. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* (1983), 305, p709-712.
102. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit R, Eisner W, Maslow J, McGeer A, Low D y Novick R. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* (1993), 259, p227-230.
103. Lange C, Cardoso M, Senczek D y Schwarz S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol* (1999), 67, p127-131.
104. Lee C. Cloning of genes affecting capsule expression in *Staphylococcus aureus* strain M. *Molec. Microbiol.* (1992), 6, p1515-1522.
105. Lee C y Lee J. Staphylococcal capsule. En: *Gram-positive pathogens*, Fischetti V (ed). ASM Press, Washington. (2000), p361-366.

106. Lee J, Betley M, Hopkins C, Perez N y Pier G. Virulence studies, in mice, of transposon-induced mutants of *Staphylococcus aureus* differing in capsule size. *J Infect Dis* (1987), 156, p741-750.
107. Lee J, Liu M, Parsonnet J y Arbeit R. Expression of type-8 capsular polysaccharide and production of toxin shock syndrome toxin-1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* (1990), 28, p2612-2615.
108. Lee J, Xu S, Albus A y Livolsi P. Genetic analysis of type 5 capsular polysaccharide expression by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (1994), 176, p4883-4889.
109. Lee J. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* (1996), 4, p162-166.
110. Lee J y Pier G. Vaccine-based strategies for prevention of staphylococcal diseases. En: *The Staphylococci in human disease*. Crossley K y Archer G (ed). Churchill Livingstone, New York. (1997), p631-654.
111. Leonard B, López-Goni I y Baldwin C. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects *Brucellae* from killing by macrophages. *Vet res* (1997), 28, p87-92.
112. Levine M, Herrington D, Murphy J, Morris J, Losonsky G, Tall B, Lindberg A, Svenson S, Baqar S, Edwards M y Stocker B. Safety, infectivity, immunogenicity and *in vivo* stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in humans. *J Clin Invest* (1987), 79, p888-902.
113. Levine M, Hone D, Tacket C, Ferreccio C y Cryz S. Clinical and field trials with attenuated *Salmonella typhi* as live oral vaccines and as "carrier" vaccines. *Res Microbiol* (1990), 141, p807-816.
114. Luchansky J y Pattee P. Isolation of transposon Tn551 insertions near chromosomal markers of interest in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (1984), 159, p894-899.
115. Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J y Laufs R. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* (1994), 62, p3244-3253.
116. Mamo W, Lindahl M y Jonsson P. Enhanced virulence of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis induced by growth in milk whey. *Vet Microbiol* (1991), 27, p371-384.

117. Manlongat N, Yang T, Hinckley L, Bendel R y Krider H. Physiologic-chemoattractant-induced migration of polymorphonuclear leukocytes in milk. *Clin Diag Lab Immunol* (1998), 5, p375-381.
118. Martin S, Shoham S, Alsup M y Rogolsky M. Genetic mapping in phage group 2 *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* (1980), 27, p532-541.
119. Maslow J, Slutsky A y Arbeit R. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. En: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Application*. Persing D, Smith T, Tenover F y White T (ed). ASM Press, Washington. (1993), p563-572.
120. McAdam R, Weisbrod T, Martin J, Scuderi J, Brown A, Cirillo J, Bloom B y Jacobs W. *In vivo* growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon mutagenesis. *Infect Immun* (1995), 63, p1004-1012.
121. McKenney D, Pouliot K, Wang Y, Murthy V, Ulrich M, Doring G, Lee J, Goldmann D y Pier G. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an *in vivo*-expressed antigen. *Science* (1999), 284, p1523-1527.
122. McNamara P, Milligan-Monroe K, Khalili S y Proctor R. Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (2000), 182, p3197-3203.
123. Mei J, Nourbakhsh F, Ford C y Holden D. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* (1997), 26, p399-407.
124. Mekalanos J, Swartz D, Pearson G, Harford N, Groyne F y deWilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* (1983), 306, p551-557.
125. Mekalanos J. Live bacterial vaccines: environments aspects. *Curr Opin Biotechnol* (1994), 5, p312-319.
126. Mims C, Dimmock N, Nash A y Stephen J. The spread of microbes through the body. En: *Mims' pathogenesis of infectious disease*. Academic Press, London. (1995), p106-134.
127. Molin S, Jensen L, Kristensen C, Givskov M, Ramos J y Bej A. Suicidal genetic elements and their use in biological containment of bacteria. *Annu Rev Microbiol* (1993), 47, p139-166.

128. Morris Hooke A, Arroyo P, Oeschger M y Bellanti J. Temperature-sensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: isolation and preliminary evaluation. *Infect Immun* (1982), 38, p136-140.
129. Mullarky I, Su C, Frieze N, Park Y y Sordillo L. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* (2001), 69, p45-51.
130. Musser J y Selander R. Genetic analysis of natural populations of *Staphylococcus aureus*. En: *Molecular biology of the staphylococci*. Novick R y Skurray R (ed). VCH Publishers, New York. (1990), p59-67.
131. Myllys V, Honkanenbuzalski P, Huovinen P, Sandholm M y Nurmi E. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Vet Scand* (1994), 35, p363-369.
132. Myllys V, Ridell J, Bjorkroth J, Biese I y Pyorala S. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet Microbiol* (1997), 51, p245-251.
133. Naidu A, Forsgren A, Kalfas S, Watts J y Fournier J. Comparison between lactoferrin and subepithelial matrix protein binding in *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis. *J Dairy Sci* (1991), 74, p3353-3359.
134. Nei, M y Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* (1979), 76, p5269-5273.
135. Nelson L y Flock J. Adhesins in *Staphylococcus* as vaccines components. *Flem Vet J* (1992), 62, supl 1, p111-116.
136. Nemeth J y Lee J. Antibodies to capsular polysaccharides are not protective against experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Infect Immun* (1995), 63, p375-380.
137. Nickerson S, Owens W y Boddie R. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infections, and mammary histology dairy cows. *J Dairy Sci* (1993), 76, p1290-1297.
138. Nickerson S, Owens W y Bodie R. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J Dairy Sci* (1995), 78, p1607-1618.
139. Nilsson I, Lee J, Bremell T, Ryden C y Tarkowski A. The role of Staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect Immun* (1997), 65, p44216-44221.

140. Nnalue N y Stocker A. Test of the virulence and live-vaccine efficacy of auxotrophic and *galE* derivatives of *Salmonella choleraesuis*. *Infect Immun* (1987), 55, p955-962.
141. Norcross N y Opdebeeck J. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Vet Microbiol* (1983), 8, p397-404.
142. Nordhaug M, Nesse L, Norcross N y Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci* (1994), 77, p1267-1275.
143. Novick R. Properties of a cryptic high frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* (1967), 33, p155-166.
144. Novick R. The *Staphylococcus* as a molecular genetic system. En: Novick R (ed), *Molecular biology of the Staphylococci*. VCH Publishers, New York. (1990), p1-40.
145. Novick R, Ross H, Projan S, Kornblum J, Kreiswirth B y Mogghazeh S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO Journal* (1993), 12, p3967-3975.
146. O'Callaghan D, Maskell D, Liew F, Easmon C y Dougan G. Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in Balb/c mice. *Infect Immun* (1988), 56, p419-423.
147. O'Connell C, Pattee P y Foster T. Sequence and mapping of the *aroA* gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Gen Microbiol* (1993), 139, p1449-1460.
148. Outteridge P y Lee C. The defense mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. *Prog Vet Microbiol Immun* (1988), 4, p165-170.
149. Ouyang S, Sau S y Lee C. Analysis of the promoter for the expression of type 8 capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. 98th General Meeting of the American Society for Microbiology, Washington. (1998), abstract B-416.
150. Oyston P, Russell P, Williamson E y Titball W. An *aroA* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated in guinea pigs, but virulent in mice. *Microbiology* (1996), 142, p1847-1853.
151. Pankey J, Boddie N, Watts J y Nickerson S. Evaluation of protein and a commercial bacterin vaccine against *Staphylococcus aureus* using mastitis experimental challenge. *J Dairy Sci* (1985), 68, p726-731.
152. Pantucek R, Gotz F, Doskar J y Rosypal S. Genetic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase-positive *Staphylococcus* species estimated by

- macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* (1996), 46, p216-222.
153. Pattee R y Neveln A. Transformation analysis of three linkage groups in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* (1975), 124, p201-204.
 154. Pattee R. Distribution of Tn551 insertion sites responsible for auxotrophy on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *J Bacteriol* (1981), 145, p479-488.
 155. Pattee P, Lee H y Bannantine J. Genetic and physical mapping of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. En: *Molecular biology of the staphylococci*. Novick R (ed). VCH Publishers, New York. (1990), p41-58.
 156. Perkins J y Youngman P. A physical and functional analysis of Tn917, a *Streptococcus* transposon in the Tn3 family that functions in *Bacillus*. *Plasmid* (1984), 12, p119-138.
 157. Persson K, Sandgren C y Rodriguez-Martinez H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues using indium-III-labeled neutrophils and biopsies. *Am J Vet* (1992), 53, p2235-2239.
 158. Philpot W y Nickerson S. Mastitis: counterattack. (1991), p1-133. Babson Bros. Co., Naperville.
 159. Pitcher D, Saundres N y Owen R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* (1989), 8, p151-153.
 160. Pittard A. Biosynthesis of the aromatic amino acids. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt F, Curtis III, Ingraham J, Lin E, Low K, Magasanik B, Reznikoff W, Riley M, Schaechter M y Umberger H (ed), ASM Press, Washington. (1996), p458-484.
 161. Pohlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser K, Doring G, Lee J, Fournier J, Botzenhart K y Wolz C. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator *agr*, and bacterial growth phase. *Infect Immun* (2000), 68, p4865-4871.
 162. Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L y Fournier J. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol* (1988), 26, p38-40.
 163. Poutrel B, Mendolia C, Sutra L y Fournier J. Reactivity of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cow and goat milk with monoclonal antibodies to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8. *J Clin Microbiol* (1990), 28, p358-360.

164. Proctor D, Chropa S, Rubenstein S, Jokela J y Uhl L. Mycobacteremia and granulomatous hepatitis following initial intravesical Bacillus Calmette-Guerin instillation for bladder carcinoma. *Am J Gastrol* (1993), 88, p1112-1115.
165. Projan S y Novick R. The molecular basis of pathogenicity. En: *The Staphylococci in Human Disease*, Crossley K y Archer G (ed), Churchill Livingstone, New York. (1997), p55-81.
166. Pyorala S y Pyorala E. Efficacy of bovine clinical mastitis therapy during lactation. *Proceedings, XVII Nordic Veterinary Congress*, (1994).
167. Raimundo O, Deighton M, Capstick J y Gerraty N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Vet Microbiol* (1999), 66, p275-284.
168. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A y Novick R. Regulation of exoprotein gene expression by *agr*. *Mol gen Genet* (1986), 202, p58-61.
169. Reed L y Muench h. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* (1938), 27, p493-497.
170. Reiter B. Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum. *Ann Rech Vet* (1978), 9, 205-213.
171. RiboPrinter, Microbial Characterization System, cap 2, Guía del Usuario, Qualicon.
172. Rivas A, Gonzalez R, Wiedmann M, Bruce J, Cole E, Bennett G, Schulte H, Wilson D, Mohammed H y Batt C. Diversity of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ribotype recovered from New York dairy herds. *Am J Vet Res* (1997), 58, p482-487.
173. Robbins J y Schneerson R. Polysaccharide-protein conjugates. A new generation of vaccines. *J Infect Dis* (1990), 161, p821-832.
174. Roberts F, Roberts C, Johnson J, Kyle D, Krell T, Coggins J, Coombs g, Milhous W, Tzipori S, Ferguson D, Chakrabarti D y MacLeod R. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature* (1998), 393, p801-805.
175. Roberts M, Maskell D, Novotny P y Dougan G. Construction and characterization *in vivo* of *Bordetella pertussis aroA* mutants. *Infect Immun* (1990), 58, p732-739.
176. Ruffo G y Zecconi A. Update on mastitis aetiology and epidemiology. En: XVIII World Buiatr. Cong. Bologna, Italia. World Buiatr. Assoc. Bologna, Italia. (1994), p167-175.

177. Ryding U, Flock J, Flock M, Soderquist B y Christensson B. Expression of collagen-binding protein and types 5 and 8 capsular polysaccharide in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis (1997), 176, p1096-1099.
178. Sambrook J, Fritsch E y Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
179. Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L y Pyorala S. The bovine udder and mastitis. Sveriges Lantbrukuniversitet, Finlandia. (1995).
180. Sandman K, Losick R y Youngman P. Genetic analysis of *Bacillus subtilis* *spo* mutations generated by Tn917-mediated insertional mutagenesis. Genetics (1987), 117, p603-617.
181. Sanger F, Nicklen S y Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA (1977), 74, p5463-5467.
182. Sau S, Bhasin N, Wann E, Lee J, Foster T y Lee C. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. Microbiology (1997), 143, p2395-2405.
183. Schroeder C y Pattee P. Transduction analysis of transposon Tn551 insertions in the *trp thy* region of the *Staphylococcus aureus* chromosome. J Bacteriol (1984), 154, p395-398.
184. Schwarzkopf A y Karch H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limit for use as epidemiological marker. J Clin Microbiol (1994), 32, p2407-2412.
185. Sears P, Norcross N, Kenny K, Smith B, Gonzalez R y Romano M. Resistance to *Staphylococcus aureus* infections in staphylococcal vaccinated heifers. Proc Intl Symp Bovine Mastitis, Indianapolis. (1990), p69.
186. Selander R y Musser J. Populations genetics of bacterial pathogenesis. En: Molecular basis of bacterial pathogenesis, the bacteria, vol XI. Iglewski B y Clark V (ed). Academic Press Inc. (1990), p11-36.
187. Sigwart D, Stocker B y Clements J. Effect of a *purA* mutation on the efficacy of *Salmonella* live vaccine vectors. Infect Immun (1989), 57, p1858-1861.
188. Simmons C, Hodgson A y Strugnell R. Attenuation and vaccine potential of *aroQ* mutants of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect Immun (1997), 65, p3048-3056.
189. Sjostrom J y Phillipson L. Role of the phi-11 phage genome in competence of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol (1974), 119, p19-21.

190. Smith K y Oliver S. Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. En: The Ruminant Immune System. Butler J (ed), Plenum Press, New York. (1981), p535-543.
191. Sneath P y Sokal R. Numerical taxonomy. W H Freeman & Co, San Francisco, (1973).
192. Soltys J y Quinn M. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. Infect Immun (1999), 67, p6293-6302.
193. Sompolinsky D, Samura Z, Karakawa W, Vann W, Schneerson R y Malik Z. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. J Clin Microbiol (1985), 22, p828-834.
194. Sordillo L y Nickerson S. Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. Am J Vet Res (1988), 49, p1112-1115.
195. Sordillo L, Campos M y Babiuk L. Antibacterial activity of bovine mammary lymphocytes following treatment with interleukin-2. J Dairy Sci (1991), 74, p3370-3374.
196. Sordillo L, Shafer-Weaver K y DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. J Dairy Sci (1997), 80, p1851-1865.
197. Strickberger M. Probability and statistical testing. Genetics. Macmillan Publishing Company, New York. (1985), p126-140.
198. Stull T, Lipuma J y Edlind T. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis (1988), 157, p280-284.
199. Su C, Herbelin C, Frieze N, Skardova O y Sordillo L. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isoaltes from dairy cattle in different geographical areas. Epidemiol Infect (1999), 122, p329-336.
200. Su C, Kanevsky I, Jayarao B y Sordillo L. Phylogenetic relationships of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. Vet Microbiol (2000), 71, p53-58.

201. Sutra L y Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol (1993), 40, p79-83.
202. Taylor B, Dellinger J, Cullor J y Scott J. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. Cell Immunol (1994), 156, p245-249.
203. Tenover F, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert G, Hill B y Hollis R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol (1994), 32, p407-415.
204. Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D y Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol (1995), 33, p2233-2239.
205. Tenover F, Arbeit R, Goering R y the Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol (1997), 18, p426-439.
206. Thakker M, Park J, Carey V y Lee J. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. Infect Immun (1998), 66, 5183-5189.
207. Thompson J, Higgins D y Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research (1994), 22, p4673-4680.
208. Tollersrud T, Kenny K, Reitz A y Lee J. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp from Europe and the United States. J Clin Microbiol (2000), 38, p2998-3003.
209. Triglia T, Peterson M y Kemp D. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequence. Nucleic Acids res (1988), 16, p8186-8189.
210. Tsen H, Yu G y Yu H. Comparison of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. J Appl Microbiol (1997), 82, p485-493.

211. Van de Peer Y y de Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* (1994), 10, p569-570.
212. Vandeyar M y Zahler S. Chromosomal insertions of Tn917 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* (1986), 167, p530-534.
213. Vaughn L, Smith P y Foster T. An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis. *Infect Immun* (1993), 61, p2172-2181.
214. Verma N y Lindberg A. Construction of aromatic dependent *Shigella flexneri* 2a live vaccine candidate strains: deletion mutations in the *aroA* and the *aroD* genes. *Vaccine* (1991), 9, p6-9.
215. Versalovic J, Koeuth T y Lupski J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids res* (1991), 19, p6823-6831.
216. Wann E, Dassy B, Fournier J y Foster T. Genetic analysis of the *cap5* locus of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* (1999), 170, p97-103.
217. Watson D y Watson N. Expression of pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Res Vet Sci* (1989), 47, p152-157.
218. Watson D y Schwartzkoff C. A field trail to test the efficacy of a staphylococcal matitis vaccine in comercial dairies in Australia. *Proc Intl Symp Bovine Mastitis, Indianapolis*. (1990), p73.
219. Webster J, Bannerman T y Hubner R. Identification of the *Staphylococcus sciuri* group with *EcoRI* fragments containing rRNA sequences and description of *Staphylococcus vitulus* sp nov. *Int J Syst Bacteriol* (1994), 44, p454-460.
220. Welkos S y O'Brien A. Determination of median lethal and infectious doses in animal model system. *Methods in Enzymology* (1994), 235, p29-35.
221. Whittam T. Genetic population structure and pathogenicity in enteric bacteria. En: *Population genetics of bacteria*. Baumberg S, young J, Wellington E y Saunders J (ed). Cambridge University Press. (1995), p217-245.
222. Wiedmann M, Bruce J y Knorr R. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *J Clin Microbiol* (1996), 34, p1086-1090.

223. Witte W. Diagnostics, typing and taxonomy. En: Gram-positive pathogens. Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D y Rood J (ed). ASM Press, Washington. (2000), p309-316.
224. Wright B. A biochemical mechanism of nonrandom mutations and evolution. J Bacteriol (2000), 182, p2993-3001.
225. Yancey Jr R. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. Adv Vet Med (1999), 41, p257-273.
226. Yao L, Berman J, Factor S y Lowy F. Correlation of histopathologic and bacteriologic changes with cytokine expression in an experimental murine model of bacteremic *Staphylococcus aureus* infection. Infec Immun (1997), 65, 3889-3895.
227. Yoshida K, Ichiman Y y Narikawa S. Staphylococcal capsular vaccine for the preventing mastitis in two herds in Georgia. J Dairy Sci (1984), 67, p620-626.
228. Youngman P. Plasmid vectors for recovering and exploiting Tn917 transpositions in *Bacillus* and other gram-positive bacteria. En: Plasmid: a practical approach. Hardy K (ed), IRL Press, Oxford. (1987), p79-104.
229. Youngman P, Poth H, Green B, York K, Olmedo G y Smith K. Methods for genetic manipulation, cloning, and functional analysis of sporulation genes in *Bacillus subtilis*. En: Regulation of procaryotic development. Smith I, Slepecky R y Setlow P (ed). ASM Press, Washington. (1989), p65-88.
230. Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, Sampimon O, verbrugh H, Schukken Y y Belkum A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol (2000), 38, p1931-1939.
231. Zeconi A. Intramammary infections and udder defenses: the search for a new equilibrium. Flem Vet J (1997), 66, p85-91.
232. Zuccarelli A, Roy I, Harding P y Couperus J. Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol (1990), 28, p97-102.