



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Química Biológica

Pérdida de expresión de cápsula en *Staphylococcus aureus* en la
infección crónica: factores causales y significado del hallazgo

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Microbiología

Lorena P. N. Tuchscher

Director de Tesis: Dr. Daniel O. Sordelli

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires
Paraguay 2155, 1121, Buenos Aires – ARGENTINA

Marzo, 2007

A mi madre

A toda mi familia

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Daniel Sordelli, mi Director de Tesis por todo lo que me brindó estos años, no sólo en el área de investigación sino en cada momento en que lo necesité. Por darme todo su cariño, por enseñarme un camino diferente en la tarea científica y en la vida misma y por todos los momentos buenos y malos en los que me alentó para seguir adelante. Por ser un gran ejemplo a seguir para mí y guiarme en este camino con toda su grandeza y humildad que lo caracteriza.

Agradezco a Lore M y Sabry por la gran mano que me dieron siempre, a Mony, Sebas, Maribel, Cris, Lu, Sol, Santy, Fer, Pao y Agus por compartir todos los momentos conmigo en el lab entre corridas, cafecitos y pequeñas charlitas. Y sobre todo, porque muchos de ustedes son grandes amigos.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del área Bacteriología que me acompañaron y compartieron todo este tiempo conmigo entre tareas científicas y mis locuras.

Agradezco a todo el personal no docente que siempre mostró buena predisposición para la preparación del material que necesité.

Agradezco a mi madre por darme fuerzas para siempre salir adelante y lograr hacer mi camino.

Agradezco a toda mi familia por alentarme en cada paso y darme siempre ese cariño tan especial.

Agradezco a todos mis amigos que aguantaron mis ataques de estrés en cada experimento y supieron contenerme siempre.

El contenido de esta Tesis ha sido parcialmente publicado en:

De investigación original

Tuchscher LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, Sordelli DO. Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infection and Immunity* 73(12):7932-7937, 2005.

F.R. Buzzola; L.P. Alvarez; **L.P.N. Tuchscher**; Barbagelata, M.S.; Lattar, S; L. F. Calvinho y D.O. Sordelli. Differential ability of capsulated and non-capsulated *Staphylococcus aureus* from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells (en prensa de *Infection and Immunity*).

Tuchscher LPN, Gómez MI, Buzzola FR, Calvinho LF, Lee JC and Sordelli DO. **Characterization of a New Variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine Isolates of *Staphylococcus aureus*.** (en preparación).

Tuchscher LPN, Buzzola FR, Calvinho LF, Lee JC and Sordelli DO. Antibody anti-capsule selects for non- capsulated *Staphylococcus aureus* during infection in a mastitis mouse model (en preparación).

Presentaciones libres

1. **L. Tuchscher**, M. I. Gómez, D. Centrón, J. C. Lee, D. O. Sordelli. Presence of an IS431-like element is associated with loss of capsule locus in nontypeable *Staphylococcus aureus* isolates. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, 19-23 de Mayo de 2002. Salt Lake City, USA. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
2. **Tuchscher, L.**, J. C. Lee, D. O. Sordelli. Persistence of non capsulated *Staphylococcus aureus* in mouse mammary glands after intramammary Challenge. ASM 104th General Meeting | New Orleans, LA. 2004. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
3. **Tuchscher, L.**, Buzzola, Fernanda R.; Lee Jean C; Sordelli Daniel. La ausencia de microcápsulas tipos 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* contribuye a la persistencia en la glándula mamaria de ratones desafiados experimentalmente. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina 2004. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
4. Alvarez, Lucia; **Tuchscher, Lorena**; Barbagelata, María Sol; Lattar, Santiago; Buzzola, Fernanda; Sordelli, Daniel. Intracelularidad de *Staphylococcus aureus* en células Mac-T: Estudios microbiológicos y citológicos. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina 2004. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
5. L. P. Alvarez, **L. Tuchscher**, S. Lattar, M. S. Barbagelata, R. Caccuri, F.R. Buzzola, D. O. Sordelli. Internalization of *Staphylococcus aureus* into Ephilial cell: Influence of alleles of the *agr* locus. ASM 105th General Meeting Atlanta, GA , 2005. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.

6. Alvarez, L; Barbagelata, M.S.; **Tuchscher, L.**; Lattar, S.; Sordelli, D.; Buzzola, F. Influencia de los grupos de agr en la infección persistente por *Staphylococcus aureus*. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina 2005. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
7. **Tuchscher, L.**; Alvarez, L; Barbagelata, M.S.; Buzzola, F.; Lattar, S; Sordelli, D. Pérdida de la expresión de cápsula en *Staphylococcus aureus* mediada por IS257. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina 2005. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
8. Lattar, S; **Tuchscher, L.**; Barbagelata, M.S.; Alvarez, L.; Buzzola, F.; Sordelli, D. Expresión de cápsula serotipos 5 (CP5) y 8 (CP8) en aislamientos de *Staphylococcus aureus* de pacientes con infección osteoarticular. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina 2005. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
9. Barbagelata, M.S.; Buzzola, F.; Lattar, S; **Tuchscher, L.**; Alvarez, L.; Sordelli, D. Caracterización de una mutante deficiente en aminoácidos aromáticos de *Staphylococcus aureus*. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina 2005. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
10. **L.P.N. Tuchscher**, F.R. Buzzola, L.P. Alvarez, L. F. Calvino, J.C. Lee, and D.O. Sordelli: Capsular antibodies select for loss of capsule production by *Staphylococcus aureus* during infection in a mastitis mouse model. 12th International Symposium of Staphylococci and Staphylococcal infections (ISSSI), Maastricht, The Netherlands, September 3-6, 2006. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
11. Lattar S, **Tuchscher L**, R Caccuri, Bargelata M, Alvarez L, Buzzola F, Predari S, Babieri C, Procopio A, Sordelli DO. Serotype 5 and 8 capsule polysaccharide (CP5 and CP8) expression in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with chronic bone infection. 12th International Symposium of Staphylococci and Staphylococcal infections (ISSSI), Maastricht, The Netherlands, September 3-6, 2006. Tipo de participación: asistente – presentación de trabajo.
12. **L.P.N. Tuchscher**, F.R. Buzzola, L.P. Alvarez, L. F. Calvino, J.C. Lee, and D.O. Sordelli: Capsular antibodies select for loss of capsule production by *Staphylococcus aureus* during infection in a mastitis mouse model. Congreso latinoamericano de microbiología, Pucón, Chile, del 24 al 27 de octubre de 2006.

ABREVIATURAS

ACONH ₄ :	acetato de amonio
ADN:	ácido desoxiribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
anti-PC5:	anticuerpo anti polisacárido capsular 5
anti-PC8:	anticuerpo anti polisacárido capsular 8.
BHI:	Caldo Cerebro-Corazón
°C:	grados centígrados
D	derivados
DNTPs:	desoxirribonucleótidos tri-fosfato
EDTA:	Acido etiléndiamino tetra-acético
fw	forward
GES:	Isotiocianato de guanidinio
<i>Ima</i>	Inoculación intramamaria
<i>ip</i>	Inoculación intraperitoneal
kb:	kilo bases
M:	Molar
mM:	Mili-Molar
μM:	micromolar
μg:	microgramos
μl:	microlitros
min:	minutos
mA:	miliampere
MgCl ₂ :	cloruro de magnesio
NT:	No tipificable
PC:	Polisacárido capsular
PC5:	Polisacárido capsular de tipo 5
PC8:	Polisacárido capsular de tipo 8
PFGE:	electroforesis de campo pulsado
pb:	pares de bases
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
RNC	Región no codificante
rev	reverse
rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
TSA	agar tripteína de soya
T amb:	temperatura ambiente
Tm:	temperatura de melting o pegado de primers
U:	unidades
V:	voltios

Carátula	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Publicaciones	iv
Abreviaturas	vi
Indice	vii
Resumen	xi
Abstract	xii
INTRODUCCION	1
1.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS: UN PATÓGENO OPORTUNISTA	2
1.2. INFECCIONES PERSISTENTES POR <i>S. aureus</i>	3
1.3. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE <i>S. aureus</i>	5
1.3.1. ADHESION	5
1.3.2. INVASION Y DAÑO DE LOS TEJIDOS	6
1.3.2.1. Enzimas extracelulares	6
1.3.2.2. Hemolisinas	7
1.3.3. EVASION DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HUESPED	8
1.3.3.1. Proteína A	8
1.3.3.2. Proteasa V8	8
1.3.3.3. Superantígenos	9
1.3.3.4. Leucocidinas	10
1.3.3.5. Cápsula	10
1.4. POLISACARIDO CAPSULAR DE <i>S. aureus</i>	11
1.4.1. ESTRUCTURA	12
1.4.2. GENETICA	12
1.4.3. BIOSINTESIS	15
1.4.4. ROL DEL POLISACARIDO CAPSULAR DE <i>S. aureus</i> EN LA VIRULENCIA	16
1.4.4.1. ROL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR EN LA PATOGÉNESIS DE LAS INFECCIONES INTRAMAMARIAS	18

1.4.4.2. PREVALENCIA DE <i>S. AUREUS</i> PC5+ O PC8+ EN AISLAMIENTOS DE BOVINOS CON MASTITIS	20
1.5. TRANSPOSONES Y SECUENCIAS DE INSERCIÓN EN <i>S. aureus</i>	22
1.6. VARIANTES PUNTIFORMES DE <i>S. aureus</i>	23
1.7. HIPOTESIS	24
1.8. OBJETIVO GENERAL	25
1.9. OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
MATERIALES Y METODOS	28
2.1. SOLUCIONES	29
2.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO	29
2.3. EXTRACCION DE ADN CROMOSOMAL	32
2.4. EXTRACCION DE ARNm	33
2.5. RT PCR	33
2.6. SOUTHERN BLOT	34
2.7. PCR	34
2.7.1. Identificación de <i>S. aureus</i>	34
2.7.2. Cebadores	35
2.7.3. Detección de genes específicos del “cluster” <i>cap5</i> o <i>cap8</i>	35
2.7.4. Obtención del fragmento de ADN ubicado entre los genes <i>adhE</i> y <i>aldA</i>	36
2.7.5. Detección del elemento IS	37
2.7.6. Ubicación del elemento IS <i>cap</i> en cepas <i>cap5(8)</i> -IS <i>cap</i> ⁺	37
2.7.7. Búsqueda de elementos IS dentro del “cluster” <i>cap</i>	38
2.7.8. Detección de genes <i>qacA/B</i> , <i>qacE</i> y <i>qacC</i> (<i>smr</i>)	39
2.7.9. Detección de genes <i>mecA</i>	40
2.8. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE AGAROSA	41
2.8. SECUENCIACION DEL FRAGMENTO DE ADN UBICADO ENTRE LOS GENES <i>adhE</i> y <i>aldA</i>	41
2.9.1. Purificación del producto de PCR	41
2.9.2. Análisis de los resultados obtenidos	42
2.10. DETECCION DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS <i>S. aureus</i>	42

2.11.	MODELO MURINO EXPERIMENTAL DE MASTITIS	42
2.12.	HISTOPATOLOGIA DE LOS PREPARADOS DE GLANDULA MAMARIA	43
2.13.	ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES	44
2.14.	EXPERIMENTOS DE ENRIQUECIMIENTO EN CEPAS <i>S. aureus</i> NT IN VITRO	45
2.15.	EXPERIMENTOS DE ENRIQUECIMIENTO EN CEPAS <i>S.aureus</i> NT IN VIVO	46
2.16.	MODELO DE BACTEREMIA MURINA POR <i>S. aureus</i>	46
2.17.	ANALISIS DE PRODUCCION DE HEMOLISINAS α Y β POR <i>S. aureus</i>	47
2.18.	CONSIDERACIONES ESTADISTICAS	47
2.19.	DEFINICIONES	48
RESULTADOS		49
3.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO	50
3.1.1.	Conclusiones parciales	52
3.2.	ESTUDIO DE IS <i>cap</i> : SECUENCIA Y FUNCIONALIDAD DE LA TRANSPOSASA	55
3.2.1.	Análisis de la secuencia obtenida por la amplificación del elemento IS en cepas NT y <i>cap5(8)</i>	55
3.2.1.1.	Conclusiones Parciales	60
3.2.2.	Estudio de funcionalidad de la IS <i>cap</i> (e) e IS <i>cap</i> (i) en cepas NT	60
3.2.2.1	Conclusiones Parciales	61
3.3.	ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS A TRAVES DE LOS CUALES PUDO HABERSE PRODUCIDO LA PERDIDA DE LOS GENES <i>cap</i> EN LAS CEPAS DE <i>S. aureus</i> NT.	61
3.3.1.	Conclusiones Parciales	63
3.3.2.	Análisis de la secuencia obtenida por la amplificación del elemento IS en aislamientos humanos de <i>S. aureus</i>	63
3.3.2.1.	Conclusiones Parciales	63
3.4.	ESTUDIO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA COMO POSIBLES FACTORES DE SELECCIÓN PARA LA ADQUISICION DE LA IS257/ <i>cap</i>	64
3.4.1.	Selección por factores externos: antimicrobianos y antisépticos	64
3.4.1.1.	Conclusiones Parciales	65
3.5.	RESUMEN DE HALLAZGOS E HIPÓTESIS	65
4.	PERSISTENCIA DE CEPAS NO CAPSULADAS DE <i>S. aureus</i>	66

4.1.	Modelo murino de mastitis	66
4.1.1.	Conclusiones Parciales	68
4.2.	Histopatología de las glándulas infectadas	69
4.2.1.	Conclusiones Parciales	71
4.3.	Internalización de <i>S. aureus</i> en células MAC-T	72
4.3.1.	Conclusiones Parciales	73
5.	SELECCIÓN DE CEPAS NO CAPSULADAS DE <i>S. aureus</i>	73
5.1.	Selección de cepas NT por factores relacionados con la respuesta del huésped.	73
5.1.1.	Conclusiones Parciales	75
5.2.	Efecto del suero anti-PC5 sobre <i>S. aureus</i> en la glándula mamaria	76
5.2.1.	Conclusiones Parciales	76
5.3.	Selección de cepas NT de <i>S. aureus</i> en la glándula mamaria por suero anti-PC5	77
5.3.1.	Conclusiones Parciales	80
5.4.	Selección de variantes puntiformes de <i>S. aureus</i> en la glándula mamaria por suero anti-PC5	80
5.4.1.	Conclusiones Parciales	82
5.5.	Patogénesis de <i>S. aureus</i> PC+ y NT	82
5.5.1.	Conclusiones Parciales	85
5.6.	Estudio de cepas NT de <i>S. aureus</i> en un modelo de bacteremia	86
5.6.1.	Conclusiones Parciales	87
DISCUSION		88
	Discusión	89
CONCLUSIONES		107
	CONCLUSIONES PARCIALES	108
	CONCLUSIÓN GENERAL Y FUTURO	112
BIBLIOGRAFIA		113
	BIBLIOGRAFIA	114

Pérdida de cápsula en *Staphylococcus aureus* en la infección crónica: factores causales y significado del hallazgo

Resumen

Staphylococcus aureus es agente causal de infecciones de importancia médica y veterinaria. En Argentina, muchos aislamientos bovinos de *S. aureus* de Argentina son no capsulados e incluso gran parte de éstos muestran una delección de los genes *cap5(8)* mediada por una variante de IS257, arbitrariamente definida como IS*Scap*. La hipótesis nula de este trabajo es que las cepas NT bovinas de *S. aureus* de Argentina podrían estar siendo co-seleccionadas por factores asociados a la presencia de la IS*Scap*, como el uso de amonios cuaternarios o ciertos antibióticos. De no ser este el caso, la hipótesis alternativa es que la ausencia de cápsula provee a la bacteria una ventaja adaptativa que le permite persistir en el huésped bovino crónicamente infectado. En el marco de esta hipótesis, el objetivo general de este trabajo de investigación es caracterizar por métodos moleculares el locus *cap* en cepas NT a fin de determinar si existe un mecanismo evolutivo definido que pueda explicar la pérdida de los genes que codifican para la síntesis de microcápsula en *S. aureus*. Asimismo, se investigó las posibles ventajas adaptativas de las cepas NT sobre las capsuladas en un modelo murino de mastitis como también los posibles determinantes que puedan seleccionar este fenotipo in vivo.

Palabras claves: *S. aureus*, cápsula, IS257, IS*Scap*, no tipificables, persistencia, mastitis.

**Loss of capsule expression by *Staphylococcus aureus* in chronic infection:
causative factors and pathological significance of this finding**

Abstract

Staphylococcus aureus is the causative agent of infections of medical and veterinary importance. Most staphylococcal bovine isolates from Argentina are non-typeable (NT) (i.e.: do not possess capsules serotype 5 or 8) and most of them have a deletion of the *cap5(8)* gene cluster mediated by an IS257 variant, arbitrarily defined as *Iscap*. The null hypothesis of this study is that NT *S. aureus* bovine isolates from Argentina could be co-selected by factors related to the presence of *Iscap*, as quaternary ammonium salts or certain antibiotics. If it is not the case, the alternative hypothesis is that the absence of capsule may provide the bacteria with an adaptive advantage, which would allow the persistence in chronically infected bovines. The general objective of the present study is the characterization of the *cap* locus by molecular methods in NT isolates in order to determine whether the lack of capsule could be a result of an evolutionary mechanism. In addition, we investigated the possible adaptive advantages of NT *S. aureus* in comparison with capsulated isolates in the experimental mouse model of *S. aureus*-induced mastitis, as well as the possible determinants that could select such phenotype.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, capsule, IS257, persistence, mastitis.

Introducción

1.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS: UN PATÓGENO OPORTUNISTA

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*. Las bacterias pertenecientes al género se caracterizan por ser cocos gram positivos, anaerobios facultativos, los cuales al dividirse quedan parcialmente adheridos por lo que presentan una agrupación característica en racimos irregulares. Los estafilococos son inmóviles, catalasa-positivos, oxidasa-negativos y no forman esporas. De todas las especies pertenecientes a éste género, la de mayor importancia médica es *Staphylococcus aureus* que se caracteriza por producir coagulasa (134).

S. aureus es un comensal de la piel y las superficies mucosas. Sin embargo, la ruptura de alguna de estas barreras permite que esta bacteria se convierta en el agente causal de infecciones de importancia médica y veterinaria. En el hombre *S. aureus* aparece como patógeno oportunista en individuos de la comunidad u hospitalizados. Las infecciones asociadas a este microorganismo suelen ser recurrentes o persistentes a pesar de la presencia de anticuerpos específicos circulantes y asociados a mucosas, y del uso de antibióticos a los cuales la bacteria es susceptible. Los mecanismos que determinan dicha persistencia aún no han sido totalmente esclarecidos (7, 101), pero se ha sugerido que la baja eficiencia lograda mediante la antibioticoterapia se debe en gran parte a la capacidad de *S. aureus* de sobrevivir intracelularmente. Recientemente, se ha descrito que en un cultivo de células epiteliales mamarias bovinas *S. aureus* puede escapar del endosoma al citoplasma debido a la regulación de ciertos genes por *agr* (sistema regulador de *S. aureus*). Asimismo, utilizando la misma línea celular, se ha visto una correlación entre la activación del regulón *agr*, la expresión de toxinas de membrana estafilocócicas y la permeabilización de la membrana endosomal. La alta densidad poblacional de *S. aureus* en el endosoma podría activar el *agr* por medio de “quórum sensing” (autorregulación). Después del escape de *S. aureus* del endosoma al citoplasma, la bacteria puede permanecer por largos períodos, derivando en infecciones

persistentes. Estas características han sido asociadas a una subpoblación de mutantes conocida fenotípicamente como “small colony variants” o variantes puntiformes. En esta subpoblación, la capacidad de supervivencia intracelular se relaciona con la reducida producción de alfa-hemolisina (4).

1.2. INFECCIONES PERSISTENTES POR *S. aureus*

Entre las principales infecciones persistentes que *S. aureus* puede ocasionar en humanos se encuentran la osteomielitis y la endocarditis. La osteomielitis se caracteriza por una respuesta supurativa aguda, que contribuye a la necrosis tisular, la fractura del hueso y la remoción del calcio. La infección puede extenderse a las estructuras óseas vecinas, interrumpiendo el aporte vascular y produciendo la necrosis de más tejido óseo contiguo. En este punto puede establecerse la fase crónica, cuando grandes segmentos de hueso avascular se separan y forman secuestros (85, 118). La endocarditis infecciosa implica la infección de la superficie endocárdica del corazón, siendo las válvulas cardíacas las zonas afectadas con mayor frecuencia. Durante la endocarditis producida por *S. aureus* pueden producirse además abscesos miocárdicos, pericarditis purulenta y abscesos del anillo valvular (118).

Entre las infecciones persistentes que *S. aureus* puede ocasionar en animales, esta bacteria es la causa predominante de infecciones intramamarias crónicas en rumiantes destinados a la lechería. La mastitis infecciosa constituye la enfermedad más costosa de la industria láctea (120). Entre los perjuicios que genera esta infección, la disminución de la producción y calidad de la leche, así como el incremento de los costos veterinarios y la acumulación de animales por lesiones, infección crónica de la glándula mamaria, o la muerte del animal, son problemas de trascendental importancia (135). Asimismo, esta enfermedad posee gran relevancia no sólo por su incidencia en la economía sino también por su incidencia en la salud pública, ya que la leche es una

fuelle de patógenos para el hombre o puede contener en algunos casos antibióticos residuales (83). En el ganado, la piel de las ubres y pezones, así como también las ubres infectadas constituyen el principal reservorio de *S. aureus* (14; 116). En prácticamente todos los casos, las bacterias causantes de mastitis logran penetrar la glándula mamaria a través del canal del pezón, evadiendo la respuesta humoral y celular local. *S. aureus* puede colonizar el extremo del canal del pezón, especialmente cuando éste se encuentra dañado o erosionado. Una vez allí, la bacteria puede persistir y ascender por multiplicación a través del canal. El ascenso puede ocurrir por propulsión directa (movimientos de las bacterias, capilaridad) o indirecta (impactos por la máquina de ordeñar) o por la suma de ambos procesos (116). La colonización del canal del pezón parecería ser un paso indispensable para el desarrollo de la infección y cuanto más cerca de la cisterna ocurre la colonización del canal, mayor es el riesgo de infección (13, 116). La habilidad de *S. aureus* para adherirse a las células epiteliales y proteínas extracelulares cumple un rol fundamental en la colonización y desarrollo de la enfermedad. Asimismo, *S. aureus* expresa factores de virulencia relevantes para causar daño en el tejido, facilitar la dispersión de la infección y neutralizar los mecanismos de defensa del huésped (21). El contacto de las bacterias con la leche puede permitir su transferencia dentro de la cisterna cuando la presión intramamaria aumenta (1, 2). *S. aureus* produce varios factores de virulencia, incluso productos de superficie que son secretados como leucotoxinas y enterotoxinas. El patrón de infección para las infecciones intramamarias es diferente de animal en animal, dependiendo de las distintas cepas de estafilocóccicas. De hecho algunos trabajos sugieren que existirían sólo algunos clones involucrados en el desarrollo de la mastitis bovina. Estos clones expresarían un patrón de factores de virulencia específico (137)

1.3. FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *S. aureus*

S. aureus es un patógeno multifactorial y como tal produce una gran variedad de factores de virulencia. Estos participan en la adhesión a las células del huésped, en la invasión y daño de los tejidos, y en la evasión de los mecanismos de defensa del huésped. Las patologías producidas por *S. aureus* involucran a tres clases de factores: a) proteínas de secreción, que incluyen los superantígenos (Sags), b) citotoxinas y enzimas degradadoras de tejidos y c) factores asociados a las envolturas como proteínas de unión a superficie (MSCRAMMs: “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”). Estas últimas, incluyen a la proteína de unión a la fibronectina, proteína de unión al fibrinógeno, otras adhesinas y antiopsoninas y los componentes de la superficie celular, como la cápsula y otros componentes de la pared celular de peptidoglicano (88). Sin embargo, las diferentes infecciones causadas por esta bacteria pueden correlacionarse con la expresión diferencial de grupos específicos de factores de patogenicidad (101, 116).

1.3.1. ADHESION

Las adhesinas son las moléculas encargadas de unir la bacteria a los componentes tisulares para resistir la fagocitosis y otras defensas innatas del huésped (52, 32). En este sentido, se ha propuesto que existen interacciones específicas y no específicas entre receptores de la pared bacteriana y componentes de las células del huésped (116). Algunas cepas de *S. aureus* poseen una superficie altamente hidrofóbica que podría favorecer la adhesión de las bacterias a las células del huésped mediante interacciones hidrofóbicas con la membrana celular. Asimismo, *S. aureus* puede unirse a proteínas extracelulares del huésped tales como colágeno y fibronectina a través de las proteínas de unión a colágeno (CnBP) y de las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) respectivamente (54; 66; 116, 88).

1.3.2. INVASION Y DAÑO DE LOS TEJIDOS

1.3.2.1. Enzimas extracelulares

S. aureus produce numerosas enzimas extracelulares, tales como hialuronidasa, fosfatasa, nucleasa, lipasa, catalasa, fibrinasa, colagenasa y serino-proteasa, entre otros (28). Dichas enzimas pueden degradar moléculas orgánicas en el ambiente para obtener nutrientes bacterianos. La degradación de constituyentes de tejidos facilita la difusión de la bacteria en el tejido y contribuye a la virulencia de los estafilococos, atacando moléculas involucradas en la defensa del huésped contra la infección (110). Asimismo, *S. aureus* produce coagulasa, una proteína que se une a la protrombina del suero, la activa y desencadena la coagulación (101, 94). El rol de la coagulasa en la patogénesis de las infecciones estafilocócicas no se encuentra totalmente dilucidado. Una función posible podría ser que los coágulos de fibrina alrededor del sitio de la infección protejan a la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped. En estudios realizados con mutantes deficientes en la producción de coagulasa se observó que la reducción en la virulencia dependía del modelo experimental utilizado, lo cual sugiere que este factor de patogenicidad podría ser más relevante en algunos tipos de infección que en otros (137; 99). La coagulasa y la estafiloquinasa no poseen actividad enzimática en sí mismas pero sirven de cofactores para ciertas enzimas en el huésped. Recientemente, se ha descrito que la estafiloquinasa induce la degradación de dos de las más importantes opsoninas humanas: inmunoglobulina G (IgG) y C3b; dando por resultado un eficiente mecanismo para la evasión de la opsonofagocitosis (106).

La producción de estos factores de virulencia está controlada por el regulador global *agr* por medio de RNAlII, que también puede ser regulado por la familia de *SarA* y proteínas homólogas (3). La patogenicidad de *S. aureus* es un proceso complejo que involucra la expresión de diversos factores de virulencia por medio de reguladores globales que a su vez activan varios grupos de genes. Las dos familias principales de

reguladores estafilocócicos son: 1) el sistema regulatorio de dos componentes (TCRS) entre los que se encuentran *agr*, *saeRS*, *arlA/B*, *srrA/B* entre otros, y, 2) la familia de proteínas homólogas a SarA. La respuesta a estímulos ambientales esta controlada por la vía alternativa de factores sigma que son activados generalmente por la célula más que por señales de transducción. *S. aureus* posee dos factores sigma: B y H. Sigma B es requerido para la activación de genes involucrados en la síntesis de pigmentos, defensa contra el estrés oxidativo, biosíntesis de la pared celular, ciertas adhesinas, entre otros; mientras que inhibe la producción de exoproteínas y toxinas. Sigma B es activado en situaciones de estrés y por depleción de ATP celular. Sin embargo, los patrones regulatorios globales en *S. aureus* son muy complejos e incluyen múltiples interacciones, retroalimentaciones y solapamiento de de genes (23).

1.3.2.2. Hemolisinas

Las hemolisinas α , β , γ y δ son agentes citotóxicos que promueven la penetración de la bacteria en el tejido del huésped. Las hemolisinas α y γ poseen la capacidad de incorporarse a la estructura de la membrana celular de la célula atacada, formando poros que modifican la permeabilidad de la membrana al agua e iones, lo cual lleva a la lisis osmótica de la célula blanco. La hemolisina δ forma una hélice α anfipática que actuaría como surfactante, provocando la lisis celular muy rápidamente. La hemolisina β es una esfingomielin-fosfolipasa que altera la estructura lipídica de la membrana celular (11; 101; 116). Además de su participación en el daño a eritrocitos, leucocitos, células epiteliales y endoteliales, recientemente se ha propuesto que las hemolisinas producidas por *S. aureus* participarían en el escape de la bacteria desde el endosoma hacia el citoplasma de las células epiteliales, contribuyendo así a la persistencia en el medio intracelular (30).

1.3.3. EVASION DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HUESPED

1.3.3.1. Proteína A

La proteína A (Spa) es una molécula de superficie que tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de los anticuerpos IgG. Se ha demostrado que la Spa, tanto libre como unida a la superficie bacteriana, es capaz de inhibir la fagocitosis por neutrófilos *in vitro* (116). La unión de IgG en la orientación inversa le proporciona a la bacteria una cobertura protectora frente a la fagocitosis. El rol de la Spa como factor de virulencia *in vivo* depende, al igual que el de otros factores de patogenicidad del tipo de infección investigada (95; 52). En estudios realizados con una mutante deficiente en la producción de Spa, se observó una marcada disminución en la virulencia en un modelo murino de bacteriemia (95), pero las diferencias en un modelo murino de mastitis son menos evidentes (37). Recientemente se ha demostrado que la proteína A puede liberarse al medio e interferir con el receptor de TNF- α , inhibiendo la respuesta inflamatoria (40).

1.3.3.2. Proteasa V8

La proteasa V8 es una serín-proteasa que tiene la habilidad de clivar e inactivar a los anticuerpos IgG *in vitro*. Un segundo rol de esta proteasa involucra la protección contra péptidos antimicrobianos como por ejemplo las defensinas de los neutrófilos o las proteínas conocidas como PMPS (del inglés "platelet microbiocidal proteins"). Asimismo, esta proteasa contribuye a la destrucción de proteínas de los tejidos, promoviendo la invasión de los mismos (101; 77).

1.3.3.3. Superantígenos

Varias de las proteínas extracelulares producidas por *S. aureus* tienen la capacidad de actuar como superantígenos. Entre ellas se incluyen las enterotoxinas A, B, C, D, E, G y H, la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1 o enterotoxina F) y las toxinas exfoliativas A y B (11). Recientemente, se han incluido los tipos G a R y U (92). Estas toxinas causan respuestas eméticas cuando son ingeridos. Los superantígenos tienen la habilidad de unirse al complejo de histocompatibilidad II (MHCII) que se encuentra en la superficie de los linfocitos T (LT). Mediante ésta unión, son capaces de mediar la activación de un gran número de clones de linfocitos T en forma inespecífica. La activación descontrolada de los LT lleva finalmente a fenómenos como anergia, apoptosis y delección de LT reactivos, entre otros (34).

Por otro lado, se ha visto que existen diferencias geográficas en la producción de superantígenos (SAGs) en las cepas que producen mastitis. Algunas cepas producen enterotoxina D (SED) sólo o en combinación con la enterotoxina C (SEC) y TSST-1. Algunos trabajos sugieren que las cepas que producen SEC y TSST-1 causan mastitis clínica severa sin respuesta al tratamiento, mientras que otras investigaciones, no encuentran correlación entre las manifestaciones clínicas de la mastitis y la producción de SAGs. Recientemente, han descrito que sólo SEC tendría un rol importante en la severidad de la mastitis (122).

1.3.3.4. Leucocidinas

Las leucocidinas pertenecen a la familia de toxinas codificadas por varios genes y están conformadas por dos proteínas: S y F. La leucocidina Pantón-Valentine (PVL) es una de las leucocidinas prototípicas de *S. aureus*. La exposición de neutrófilos a PVL in

vitro deriva en el hinchamiento y redondeo de las células y sus núcleos. La lisis celular es precedida por la degranulación y ruptura del núcleo. Uno de los mayores efectos de la PVL es la rápida acumulación intracelular de Ca^{2+} , mediante la activación de canales de para este ion. La presencia de PVL ha sido asociada a ciertos tipos de infecciones cutáneas, en particular, la furunculosis, celulitis y algunos tipos de abscesos (11). Recientemente, la producción de PVL ha sido asociada con la meticilino resistencia adquirida (125) y neumonías necrotizantes severas en niños y adultos jóvenes (36). Estas patologías se caracterizan por la alta letalidad y extensiva necrosis en la mucosa traqueal y bronqueal como así también en el espacio intralveolar.

1.3.3.5. Cápsula

S. aureus puede producir una cápsula polisacárida, que puede interferir con las defensas del hospedador. Esta cápsula inhibe la acción fagocítica y bactericida de los neutrófilos mediante el bloqueo de los receptores necesarios para identificar y dar muerte a *S. aureus* (83). Se ha reportado además, la capacidad de estos polisacáridos capsulares (PC) de unirse a células epiteliales, endoteliales y monocitos estimulando la secreción de distintas citoquinas (101). Dada la importancia de este factor de virulencia para el desarrollo de este trabajo, este tema se amplía a continuación.

1.4. POLISACARIDO CAPSULAR DE *S. aureus*

Para muchos patógenos bacterianos, las cápsulas son importantes factores de patogenicidad que permiten a la bacteria evadir el sistema inmune del hospedador. Más del 90% de los aislamientos clínicos de *S.aureus* producen PC y se han llegado a

describir hasta 11 serotipos distintos (113). Sin embargo, sólo los polisacáridos de los serotipos 1, 2, 5 y 8 han sido purificados y químicamente caracterizados (93; 56). Estudios de serotipificación de aislamientos de estafilococos de diferentes colecciones de cepas que representaban numerosas regiones geográficas han revelado que entre el 75-80% de los aislamientos recuperados de humanos producen PC5 o PC8 (59; 105). Las cepas productoras de PC de tipo 1 y 2 poseen una cápsula gruesa y producen colonias mucoides al ser cultivadas en medio sólido. El rol crítico de estos dos tipos de PC en la patogénesis ha sido bien establecido (93; 71). Debido a que las cepas mucoides son fácilmente reconocibles, fueron utilizadas como prototipo en los primeros estudios sobre cápsula estafilocócica. La cepa "Smith Diffuse" es serotipo 2 y fue el primer aislamiento encapsulado de *S.aureus* que fue caracterizado. Sus propiedades biológicas son similares al serotipo 1 de la cepa "M".

Por el contrario, las cepas de *S. aureus* de los serotipos 5 y 8, producen menos cantidad de cápsula bajo las condiciones de rutina del laboratorio, por lo que fueron denominadas microcapsuladas. El rol de la microcápsula en la virulencia no es totalmente claro, dependiendo en gran medida del modelo animal utilizado (24). En la actualidad, la gran mayoría de los estudios sobre virulencia del PC se focalizan en la biología de cepas no mucoides microcapsuladas (24).

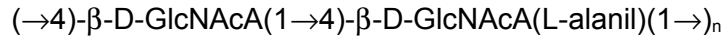
1.4.1. ESTRUCTURA

Los PC de los serotipos 5 y 8 tienen unidades repetitivas de trisacáridos similares que comprenden ácido N-acetilglucosaminurónico; ácido N-acetil-D-fucosamina; N-acetil-L-fucosamina, y difieren sólo en la unión entre el grupo amino del azúcar y la posición de O-acetilación (24; 56). (Esquema 1).

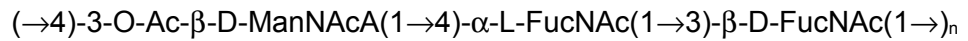
Tipo 1:



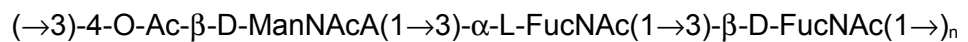
Tipo 2:



Tipo 5:



Tipo 8:



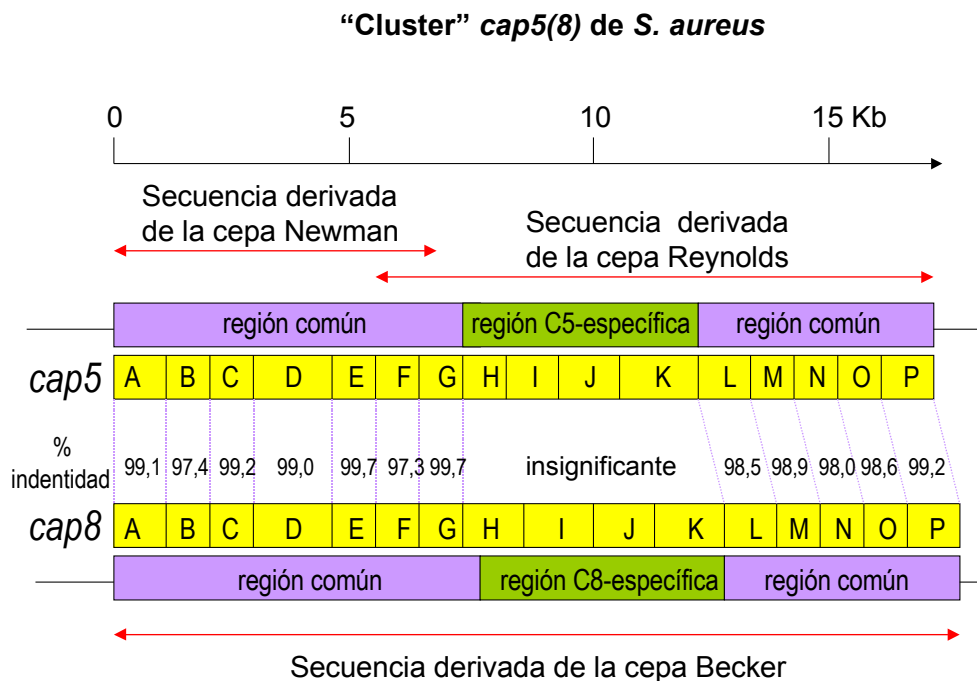
Esquema 1: Unidades repetitivas de los cuatro tipos capsulares: 1, 2, 5 y 8. GalNAcA: Acido N-acetilgalactosaminurónico; FucNAc: N-acetilfucosamina; GlcNAcA: Acido N-acetilglucosaminurónico; ManNAcA: Acido N-acetilmanosaminurónico; O-Ac: O-acetilo)

1.4.2. GENETICA

El grupo o “cluster” de 13 genes *cap1* fueron los primeros en ser secuenciados y clonados. Sin embargo, se han identificado dos genes más cuando se secuenció la región corriente abajo. Interesantemente, todo el operón *cap1* está localizado en un cassette cromosomal en el genoma de *S. aureus* (SCC), genéticamente similar al elemento que proporciona la meticilino-resistencia (SCC *mec*). Estos elementos cassettes cromosomales están localizados en el mismo sitio específico en el cromosoma de *S. aureus*, por lo tanto SCC*cap1* y SCC*mec* son alélicos. El elemento SCC*cap1* es deficiente en su movilización debido a mutaciones dentro de los genes de la recombinasa. Sin embargo, los sitios de unión son funcionales ya que la escisión del elemento pudo ser demostrado por estudios de complementación con genes funcionales de la recombinasa del elemento SCC*mec*. A pesar de que el elemento SCC*cap1* en sí y las regiones flanqueantes contienen numerosas mutaciones y reordenamientos de ADN, los genes de *cap1* están intactos y funcionales. Esta observación sugiere que SCC*cap1* se ha insertado dentro del sitio SCC mucho tiempo antes confiriéndole una ventaja de supervivencia a la cepa (71).

El hecho de que *cap1* se localice en el locus SCC implica que esa cepa podría poseer dos loci de cápsula en el cromosoma y producir simultáneamente dos tipos de cápsula diferentes. En efecto, se ha demostrado que el serotipo 1 de la cepa M contiene los genes *cap1* en el locus SCC y el cluster homólogo a *cap8* en el locus *cap(5)8*. La delección de los genes *cap1* del cromosoma bacteriano resulta en un mutante que produce un tipo diferente de cápsula. Sin embargo, no se ha demostrado que la cepa salvaje M pueda producir dos tipos de PCs al mismo tiempo. La cepa mucoide del serotipo 2 Smith también contiene dos loci de cápsula en el cromosoma como fue demostrado en experimentos de hibridación por Southern Blot (72).

Los “clusters” de genes *cap5* y *cap8*, requeridos para la producción de los PC de tipo 5 (PC5) y tipo 8 (PC8) respectivamente, han sido clonados y secuenciados (108). Los “clusters” *cap5* y *cap8* contienen 16 genes relacionados, denominados *cap5(8)A* hasta *cap5(8)P*, los cuales se transcriben en la misma orientación. Doce de los 16 genes que componen el “cluster” *cap5* son idénticos a sus correspondientes en el “cluster” *cap8*, mientras que los cuatro genes restantes de cada “cluster” son tipo-específicos. Los 4 genes específicos están ubicados en la región central del “cluster”, flanqueados por los genes comunes a los 2 tipos (93).



El análisis de secuencia del “cluster” *cap* reveló una moderada homología de los genes *cap5(8) A-D* (61% y 71% de identidad a nivel de aminoácidos, respectivamente) con *cap1 A-D* (107, 108). Los genes que componen el cluster *cap8* han sido caracterizados a nivel molecular. Al igual que los genes *cap1*, la transcripción de los 16 genes *cap8* está dirigida por un promotor principal y da lugar a la formación de un gran transcripto de aproximadamente 17kb. Asimismo, se han identificado varios promotores internos más débiles dentro del operón *cap8*. (71, 93). A pesar que los operones *cap1* y *cap8* son transcriptos en forma similar por un promotor primario localizado al comienzo del operón, el promotor de *cap1A* es 60 veces más fuerte que el promotor *cap8A*, en sus respectivos contextos genéticos. Esta diferencia puede explicar el hecho que la cápsula de tipo 1 se produce con mayor abundancia que la cápsula de tipo 8 y que las cepas que producen PC1 forman colonias mucoides, mientras que las que producen PC8 forman colonias no mucoides (93).

Aproximadamente un 20% de los aislamientos de *S. aureus* de humanos son NT, es decir, no son reactivas con anticuerpos contra los tipos capsulares 1, 2, 5 y 8. La mayoría de éstas cepas, contienen una copia intacta de los genes del “cluster” *cap5(8)* y producen el transcripto , indicando que estas cepas NT no expresan cápsula debido a mutaciones puntuales dentro de los genes esenciales para producir el polisacárido capsular. Algunos aislamientos NT producen una reducida cantidad de transcripto *cap5(8)*, y ese fenotipo se correlaciona con mutaciones dentro del promotor de *cap5(8)* o en los genes regulatorios (93). En un número de aislamientos de Argentina, se ha encontrado una delección del locus *cap5(8)* con una concomitante inserción de una secuencia de inserción (IS) de la familia IS6 (114).

1.4.3. BIOSINTESIS

La comparación de secuencias de los genes *cap* de *S. aureus* con proteínas cuya función es conocida y el uso de cepas con mutaciones o deleciones de dichos genes, permitió la asignación de funciones posibles a varios de los 16 genes *cap5(8)* (93, 108). El producto del gen *cap5(8)B* es homólogo a varias proteínas involucradas en la determinación de la longitud de la cadena de polisacáridos. Un mutante de éste gen produce la misma cantidad de polisacárido que la cepa salvaje pero con un peso molecular menor, lo cual sugiere que este gen está involucrado en la determinación de la longitud de la cadena de polisacáridos (93, 108). Se ha propuesto que el gen *cap5H* codifica para una acetil-transferasa que participa en la O-acetilación del ManNAcA. En el “cluster” *cap8*, el gen *cap8J* cumpliría la misma función (9; 93). Los genes *cap5H* y *cap8J*, están localizados en la región tipo-específica en cada operón. Esto es consistente con que la O-acetilación en el tipo capsular 5 y 8 se encuentra en diferentes posiciones del ManNAcA (93, 56). Se ha demostrado que los genes *cap5O* y *cap5P* pueden complementar con sus homólogos en *E.coli*, los genes *rffE* y *rffD*, respectivamente. El gen *rffE* codifica una UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa y el gen *rffD* codifica para una UDP-N-acetilmanosamina deshidrogenasa. Ambos genes son requeridos para la biosíntesis del ManNAcA, uno de los tres residuos de azúcares del antígeno común de las enterobacterias (93, 104). Dado que el ManNAcA también es un componente de la cápsula tipo 5 y 8 de *S. aureus*, se ha propuesto que los genes *cap5(8)O* y *cap5(8)P* tendrían funciones equivalentes a los genes *rffE* y *rffD*. Estudios *in vitro* confirmaron que el producto del gen *cap5P* tiene actividad de UDP-GlcNac-2-epimerasa (10, 93).

1.4.4. ROL DEL POLISACARIDO CAPSULAR DE *S. aureus* EN LA VIRULENCIA

El rol de la cápsula de tipo 1 y 2 en la inhibición de la fagocitosis y su contribución a la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* ha sido extensamente demostrado (93). Por el contrario, el rol de las microcápsulas producidas por las cepas de tipo 5 y 8 se encuentra en discusión. Las evidencias acerca de la virulencia que promueven estos dos tipos de PCs provienen de estudios in vitro como de experimentos realizados en distintos modelos animales de infección y colonización por *S. aureus*. Varios estudios han correlacionado la producción de cápsula con la resistencia in vitro a la fagocitosis (129). Se ha demostrado que los neutrófilos humanos pueden fagocitar los mutantes NT en presencia de suero no inmune con actividad de complemento, mientras que los aislamientos de serotipo 5 requieren suero específico anti-cápsula y complemento para lograr una óptima opsonofagocitosis (71). Se ha demostrado que un mutante con sobreproducción de PC8 fue más resistente a la opsonofagocitosis in vitro por neutrófilos humanos en comparación con la cepa parental Becker (73). Nilsson ha reportado que los macrófagos murinos fagocitaban los mutantes PC5-negativos en forma más eficiente que la cepa parental Reynolds (PC5). Una vez fagocitados los *S. aureus*, la cepa PC5 podían sobrevivir intracelularmente más eficientemente que los estafilococos de la cepa mutante (84).

Otros autores compararon la opsonización de cepas isogénicas de *S. aureus* y demostró que las cepas PC5 capturaban un 42% menos de suero complementado (C3) que el mutante acapsulado (25). Estudios in vitro adicionales indicaron que el PC8 purificado activó células T CD4+ humanos y de rata. La transferencia de células T activadas por PC8 más adyuvante en la cavidad peritoneal de ratas no expuestas a ningún patógeno, provocó la formación de abscesos peritoneales (71).

Las cepas capsuladas de *S. aureus* fueron más virulentas en modelos animales de infección estafilocócica en comparación con la mutante no capsulada. La cepa capsulada Reynolds produjo un nivel de bacteremia murina mayor y una eliminación más

lenta en el torrente sanguíneo en comparación con dos mutantes no capsuladas. Asimismo, cuando se infectaron ratones con una cepa con sobreproducción de PC8 y la cepa parental Becker, la cepa sobrecapsulada persistió por más tiempo en el torrente sanguíneo, bazo e hígado (73). La cepa Reynolds fue más virulenta que la mutante acapsulada en un modelo de infección renal y en un estudio de producción de abscesos. En efecto, la inoculación de PC5 y PC8 purificados provocó la formación de abscesos (123). Varios investigadores demostraron que la cápsula aumenta la virulencia de *S. aureus* en modelos animales de bacteriemia y artritis séptica e incluso en modelos letales de infección (71)

Recientemente, se ha demostrado que las cepas PC5+ eran más virulentas que las cepas PC8+, y éste hallazgo se correlacionaba con una mayor supervivencia del serotipo 5 en los ensayos de fagocitosis y muerte bacteriana (129). Sin embargo, en un modelo de endocarditis por catéter en ratas, las cepas PC5+ resultaron más atenuadas que las cepas mutantes acapsuladas (6; 81).

La adherencia estafilocócica a las válvulas dañadas del corazón es crítica para el inicio de la infección en un modelo de endocarditis. La correlación inversa entre la producción de cápsula y la infectividad en éste modelo, sugiere que la cápsula podría estar enmascarando las adhesinas que son determinantes de virulencia importantes en la endocarditis (93). En experimentos in vitro para evaluar la adhesión de *S. aureus* a células endoteliales indicó que la unión fue máxima en condiciones de mínima expresión de PC5. Asimismo, una mutante acapsulada mostró mayor adherencia a células endoteliales en comparación con la cepa salvaje. La restauración de la producción de PC5 por complementación dio por resultado una cepa de *S. aureus* con un fenotipo pobre para la adhesión. Similarmente, se ha observado que la expresión de PC5 y PC8 disminuye la eficiencia de una de las moléculas de adhesión ("clumping factor") de *S. aureus* que media la unión a fibrinógeno y plaquetas. Todos estos resultados indican

que la cápsula es importante para la virulencia estafilocócica, particularmente en infecciones relacionadas con el torrente sanguíneo, piel y partes blandas (71)

1.4.4.1. ROL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR EN LA PATOGÉNESIS DE LAS INFECCIONES INTRAMAMARIAS

En los primeros estadios de la infección intramamaria en bovinos por *S. aureus*, se evidencia una respuesta del huésped no específica en la que la actividad fagocítica de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) cumple un papel crucial. Los neutrófilos, como el primer fagocito que ingresa al sitio de inflamación, reconoce y elimina al organismo invasor. La fagocitosis es facilitada por las opsoninas, siendo la IgG y el componente 3 del complemento (C3) las más importantes. Este hecho se debe a la presencia de receptores para la porción Fc de la IgG y C3b o iC3b en la superficie de los PMN. Asimismo, se cree que el sistema del complemento es un importante operador en el inicio y control de la inflamación (102). Otro factor importante en la respuesta innata de la glándula mamaria es la lactoferrina. La lactoferrina (Lf) es una proteína que funciona, entre otras actividades, como quelante de iones de hierro. Esta propiedad le proporciona actividad bacteriostática y protectora de los radicales libres del huésped. Por lo tanto, *S. aureus* es susceptible a la Lf dado que ésta bacteria requiere iones de hierro para crecer (102).

En las cepas de *S. aureus* con cápsula gruesa (productoras de PC1 o PC2), la pared bacteriana se encuentra enmascarada por la misma. Este factor no limita la unión de opsoninas (inmunoglobulinas y complemento) a la pared, pero no permite la interacción de las opsoninas con los receptores de las células fagocíticas. De acuerdo a estos resultados, se puede sugerir que las cepas encapsuladas podrían requerir la presencia de anticuerpos contra la cápsula en el sitio de la infección para su

opsonización (58). No obstante, dado que cepas PC1+ o PC2+ son muy infrecuentemente aisladas de bovinos con mastitis, este tipo de polisacárido capsular podría no tener un rol relevante durante las infecciones intramamarias (58, 114).

El rol de la microcápsula de *S. aureus* durante la patogénesis de las infecciones intramamarias aún no ha sido esclarecido. Sin embargo, en un trabajo reciente in vitro con mutantes isogénicas de la cepa Reynolds, se ha demostrado que la presencia de PC del serotipo 5 u 8 reduce la eliminación de *S. aureus* por los neutrófilos bovinos. Asimismo, la actividad de estallido oxidativo no fue estimulado por las cepas capsuladas en sangre. El agregado de anticuerpos específicos anti-cápsula incrementó la fagocitosis y el estallido oxidativo contra las cepas capsuladas. La cepa capsulada no mostró diferencia en las diferentes determinaciones en presencia o ausencia de anticuerpos específicos (58). Varios investigadores han señalado que las estrategias inmunoprolácticas para la prevención de la mastitis deberían contemplar la inducción, mediante la vacunación, de anticuerpos específicos dirigidos contra la cápsula de *S. aureus*. De acuerdo a este concepto, se han desarrollado diferentes tipos de vacunas, y la mayoría de las preparaciones de vacunas experimentales evaluadas se han incluido extractos de polisacárido (70; 86; 132). Recientemente se han desarrollado vacunas de ADN (62, 110) y bacterias atenuadas (19). Sin embargo, hasta el presente no se han realizado estudios que determinen de manera directa el rol de PC5 y PC8 en modelos animales de mastitis ni su rol como determinantes antigénicos protectores. Hensen y col. , evaluaron la expresión de PC5 en la glándula mamaria de bovinos durante la infección experimental de la misma con *S. aureus* (49). En este trabajo se determinó que *S. aureus* producía PC5 tanto durante la infección temprana como durante la etapa crónica de la infección. Se observó la producción de PC5 por bacterias localizadas en los alvéolos y en contacto con el epitelio mamario. Durante el estadio crónico se observó además la producción de PC5 por bacterias localizadas en el tejido intersticial profundo.

Dada su expresión *in vivo*, se ha sugerido que el PC podría jugar un rol como factor de patogenicidad durante la mastitis estafilocócica (49).

1.4.4.2. PREVALENCIA DE *S. AUREUS* PC5+ O PC8+ EN AISLAMIENTOS DE BOVINOS CON MASTITIS

Entre los diferentes serotipos capsulares que se han propuesto para *S. aureus*, los tipos 5 y 8 son los predominantes en aislamientos provenientes de humanos infectados. Sin embargo, existe considerable variabilidad en la prevalencia de PC5 y PC8 en aislamientos provenientes de bovinos con mastitis de diferentes regiones geográficas del mundo (24).

En un estudio realizado sobre 212 aislamientos de *S. aureus* de leche de vacas con mastitis en Francia, se determinó que el 69% eran CP5+ (51%) o CP8+ (18%) (24). Guidry y col. asimismo demostraron que el 70% de 94 aislamientos provenientes de 4 países de Europa (Inglaterra, Francia, Holanda y Alemania) eran tipificables con anticuerpos anti-PC5 o anti-PC8. Las cepas NT tampoco reaccionaron con anticuerpos anti-PC1 o anti-PC2 (42). En otro estudio realizado sobre 274 aislamientos provenientes de Europa (Dinamarca, Suecia, Irlanda, Islandia y Finlandia) se observó que el 63% de los mismos producía PC5 o PC8 y sólo el 37% era NT (24, 119). Por el contrario, cuando se analizaron aislamientos provenientes de leche de bovinos con mastitis de Israel y Corea, sólo el 17% y 26% respectivamente, presentó producción de PC5 o PC8 (44, 113). Dos estudios realizados en forma independiente con aislamientos de leche de bovinos con mastitis en Estados Unidos revelaron que el 41% y el 42% de 273 y 362 aislamientos respectivamente eran NT con anticuerpos anti-PC5 o PC8 (24).

En nuestro laboratorio, se ha investigado la prevalencia de *S. aureus* productor de PC5 y PC8 en aislamientos de leche de bovinos con mastitis de 22 localidades de Argentina. Sorprendentemente, sólo 14 de los 195 aislamientos estudiados (7,1%) produjeron PC5 y 13 aislamientos (6,6%) produjeron PC8. En consecuencia, 168 aislamientos (86,3%) resultaron NT con anticuerpos anti-PC5 o anti-PC8. Entre las 22 localidades investigadas, se encontró que las 14 cepas PC5+ estaban distribuidas entre 9 distritos y las 13 cepas PC8+ en 8 distritos. En cuatro localidades se encontraron aislamientos de ambos serotipos. Las cepas NT se detectaron en 21 de las 22 localidades estudiadas (114).

En estudios preliminares, se realizaron ensayos de hibridización de DNA sobre un pequeño número de cepas NT de *S. aureus* epidemiológicamente no relacionadas, para determinar si estas cepas contenían los genes involucrados en la síntesis de cápsula. Para ello, se utilizaron diferentes sondas de ADN. Se utilizaron los fragmentos de ADN comunes entre *cap5* y *cap8* (*cap5ABCD* y *cap5LMNOP*) y fragmentos únicos para *cap5* (*cap5IJK*) o *cap8* (*cap8HIJK*). Se observó que los fragmentos *cap5ABCD*, *cap5IJK* y *cap5LMNOP* hibridizaron con el ADN cromosomal de 3 de las 8 cepas NT estudiadas. El ADN de las 5 cepas restantes no hibridizó con ninguna de las sondas empleadas (114).

1.5. **TRANSPOSONES Y SECUENCIAS DE INSERCIÓN EN *S. AUREUS***

Se han descrito varios elementos transponibles en *S. aureus* como transposones y secuencias de inserción (IS). Estas últimas son las que juegan el rol más importante en la expresión fenotípica y evolución del genoma dentro de las bacterias gram positivas.

Una de las familias de secuencias de inserción de *S. aureus* más importante es IS6. La familia IS6 fue descrita por primera vez en las secuencias repetidas directas del transposon Tn6 de *E. coli* (8). Históricamente, a muchos de estos elementos se les

atribuyó un número individual de IS y se descubrió que algunos de estos eran idénticos o con alta identidad a otros ya descritos. Se ha demostrado que varios miembros de distintas familias de ISs eran capaces de transponer. Las transposasas están relacionadas y tienen un nivel de identidad entre el 40 y 94%. Generalmente, estas transposasas tienen una longitud de 789pb (IS257) a 880pb (IS6100). Todas contienen terminaciones invertidas (IRs) de 15-20pb y generalmente originan una repetición directa de 8pb en el sitio blanco de inserción aunque no presentan selectividad de secuencias blanco (79). Interesantemente, elementos con idéntica secuencia han sido encontrados en varias especies bacterianas, indicando una relativa diseminación horizontal. Dentro de la estructura general de estas transposasas, se destaca la tríada aminoacídica que conforma el sitio catalítico. Esta tríada está conformada por tres dominios denominados N2, N3 y C1. Al mismo tiempo, dentro de esta tríada se reconoce el motivo DDE que está conservado en todos los elementos de la familia IS6. Este motivo es el más importante dentro del sitio catalítico, ya que mutaciones relevantes en este sitio derivan indefectiblemente en la pérdida de funcionalidad de la proteína (74). Muchos de estos elementos de inserción se relacionan con resistencia a antibióticos (aminoglucósidos, vancomicina, eritromicina, meticilina y mupirocina, entre otros), antisépticos y desinfectantes (sales de amonio cuaternario), metales (cadmio y mercurio) y moléculas bioactivas (prolissostafina y factor de inmunidad a lisostafina). La IS257 (conocida también como IS431), ha sido hallada en diversos contextos genéticos dentro de los estafilococos. La prevalencia de los genes de resistencia delimitados por esta secuencia de inserción ha determinado la estructura de varias transposones como el TN4003 y TN4004. Se ha descrito que esta IS desarrolla un mecanismo de transposición replicativa no resuelta. Este evento involucra dos replicones cointegrados que están fusionados por medio de una copia de la IS257. Muchos segmentos flanqueados por la IS257 representan plásmidos cointegrados dentro de un gran plásmido o del cromosoma. Frecuentemente se observan eventos de delección adyacentes a la IS257 que podrían ser el resultado de una transposición intramolecular de ésta secuencia de inserción. Sin

embargo, se ha demostrado que las fusiones y deleciones de secuencias ocurren como resultado de una recombinación homóloga que se produce entre copias preexistentes de la IS257 (31).

Dentro del genoma de *S. aureus*, se han descrito otros elementos accesorios de intercambio de genes como cassettes cromosomales (SCC*mec* y SCC*cap1*), bacteriófagos que contienen diferentes factores de virulencia, islas de patogenicidad (Sapl*bov2*, en cepas de bovinos) y plásmidos. Todos estos elementos proporcionan mecanismos de transferencia genética que derivan en la evolución del genoma de *S. aureus*. De ésta manera, el genoma de *S. aureus* presenta cierta plasticidad que le proporciona ventajas adaptativas para colonizar diferentes nichos ecológicos (90).

1.6. VARIANTES PUNTIFORMES DE *S. aureus*

Las colonias puntiformes (del inglés “small colony variants”, SCV) fueron descritas por primera vez en 1901 como una subpoblación aberrante de *Salmonella typhi*. Desde ese momento, comenzaron a describirse en distintas especies bacterianas, incluso *S. aureus* (64). Estudios previos, han demostrado que esta subpoblación era auxótrofa para menadiona, hemina y timina. Estas observaciones permitieron determinar que una alteración en el transporte de electrones en la cadena respiratoria era responsable del fenotipo SCV (127). Estas variantes fueron aisladas de abscesos, sangre, hueso, heridas, tracto respiratorio y tejidos blandos. El fenotipo SCV se caracteriza por lento crecimiento, con desarrollo de microcolonias, usualmente definidas como 10 veces más pequeñas que las de las cepas salvajes. Además de ser poco activas metabólicamente, son no hemolíticas, no pigmentadas, expresan coagulasa a las 18 hs, dan débil reacción a la prueba de la catalasa, son resistentes a gentamicina y no fermentan el manitol. El fenotipo puntiforme encontrado en aislamientos clínicos tiene

una alta tasa de reversión in vitro al fenotipo salvaje, sin dejar rastros de su fenotipo anterior, lo que dificulta su estudio y caracterización (100; 128). Asimismo, poseen una sobreexpresión de proteínas de adhesión como del factor de anclaje “clumping factor” y la proteína de unión a la fibronectina “fibronectin binding protein” que les permite lograr una internalización más eficiente (126).

En los últimos años, se ha descrito que las SCV tienen otra particularidad y es la habilidad de persistir en el medio intracelular. El medio intracelular podría proveerle de un nicho de supervivencia a la bacteria ya que el microorganismo está protegido de la terapia antibiótica y de las defensas del huésped. Mientras que las SCVs han sido reconocidas como agentes infecciosos, este fenotipo ha sido relacionado sólo recientemente con infecciones persistentes y recurrentes (128).

1.7. HIPOTESIS

En base a los resultados expuestos, se observa que existe una alta prevalencia de cepas NT en Argentina y en el mundo en aislamientos provenientes de leche de bovinos con mastitis, acompañados de una baja prevalencia de cepas capsuladas. Inclusive muchas de estas cepas carecen de la información genética necesaria para la producción de PC. Las cepas NT bovinas de *S. aureus* pueden explicarse por múltiples mecanismos: reducción de la cantidad de transcritos de *cap5(8)*, mutaciones en el promotor de *cap5A*, disminución de los niveles de ARNIII, un producto truncado del gen *arlR*, mutaciones puntuales en los genes que forman el cluster *cap5(8)* o la delección del locus *cap5(8)* mediado por la IS257 (24), siendo éste último el genotipo más prevalente en nuestro país. Asimismo, la pérdida de expresión del PC de *S. aureus* podría proporcionar ciertas ventajas adaptativas a la bacteria en su interacción con el huésped.

La hipótesis nula de este trabajo es que las cepas NT bovinas de *S. aureus* de Argentina podrían estar siendo co-seleccionados por factores asociados a la presencia de la secuencia de inserción IS257, como el uso de amonios cuaternarios o ciertos antibióticos. De no ser este el caso, la hipótesis alternativa es que la ausencia de cápsula provee a la bacteria una ventaja adaptativa que le permite persistir en el huésped bovino crónicamente infectado. Si así ocurriera, la delección del grupo de genes *cap* podría deberse a una extrema plasticidad del genoma de *S. aureus*, permitiendo la delección espontánea de los genes *cap* durante la infección, o a la selección positiva de un clon originado en tiempos ancestrales por poseer la característica de presentar un fenotipo no capsulado.

1.8. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de tesis es caracterizar por métodos moleculares el locus *cap* en cepas NT a fin de determinar si existe un mecanismo evolutivo definido que pueda explicar la pérdida de los genes que codifican para la síntesis de microcápsula en *S. aureus*. Asimismo, se estudiará en un modelo murino de mastitis bovina, el rol de la cápsula en la patogénesis de la mastitis estafilocócica.

1.9. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer la prevalencia de cepas de *S. aureus* NT que portan la IS257, aisladas de bovinos de Argentina con mastitis subclínica.
2. Determinar si se encuentra presente la delección del “cluster” *cap* mediada por la IS257 a través de la amplificación por PCR y posterior secuenciación de fragmento ubicado entre los genes “housekeeping”.

3. Dilucidar los posibles mecanismos a través de los cuales se produjo la pérdida de los genes *cap* en las cepas NT de *S. aureus* (posibles eventos de recombinación o transposición que resulten en la delección del “cluster” *cap*).
4. Investigar la posible relación entre la adquisición de la IS257 y resistencia a amonios cuaternarios y otros antibióticos relacionados con ésta secuencia de inserción.
5. Estudiar la patogénesis de las cepas NT con respecto a las cepas capsuladas, a través de un modelo murino de mastitis.
 - 5.a. Determinar si la ausencia de cápsula permite a la bacteria persistir en el huésped por períodos más prolongados.
 - 5.b. Establecer si *S. aureus* no capsulado tiene una ventaja para ser internalizado más eficientemente por las células epiteliales del huésped.
 - 5.c. Establecer si existen diferencias en los niveles de inflamación que producen *S. aureus* no capsulados, que impliquen una ventaja hacia la persistencia de la bacteria en el huésped.
6. Determinar si los anticuerpos con actividad específica contra el PC pueden seleccionar variantes NT de *S. aureus*:
 - 6.a. Investigar la aparición de cepas NT por experimentos de enriquecimiento in vitro
 - 6.b. Investigar la aparición de cepas NT por experimentos de enriquecimiento in vivo en un modelo murino de mastitis.

7. Determinar si los anticuerpos con actividad específica contra PC influyen en la selección de variantes puntiformes de *S. aureus* durante la infección mamaria experimental.

Materiales y Métodos

2.1. SOLUCIONES

GES: Isotiocianato de guanidinio: 5M Tiocianato de guanidinio, 0.1M EDTA pH 8, 0.5% N-sarcosilato de sodio.

TBE 5X: Tris-borato 0.45M, EDTA 0.01M (pH 8,0).

TE: buffer Tris-EDTA: 10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA.

2.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Este trabajo se realizó con 68 aislamientos de *S. aureus* obtenidos de leche de vacas con mastitis subclínica (Tabla 1 y 2). Estas cepas (gentilmente cedidos por la Dra. Gentilini Fac. de Cs. Veterinaria, U.B.A.) provienen de una colección de 195 cepas aisladas entre los años 1989 y 1997 en nuestro país de 17 localidades distintas (114). Estas 68 cepas son representativas de diferentes genotipos encontrados en Argentina, son epidemiológicamente no relacionadas e incluyen 44 cepas NT, 14 PC5 y 10 PC8 (114, 18). Las 68 cepas fueron seleccionadas porque diferían de las otras cepas de la colección en al menos uno de los siguientes aspectos: a) diferente pulsotipo y/o ribotipo; b) que el día de aislamiento difiera en más de un año y c) diferente sitio geográfico de procedencia (Tabla 1). Los aislamientos NT fueron no tipificables con anticuerpos anti-polisacárido capsular tipo 5 (PC5) o tipo 8 (PC8) (114) y no generan colonias mucoides sobre agar (no producen PC1 ni PC2). Adicionalmente, se analizaron 22 aislamientos recientes provenientes de Rafaela (cedidos gentilmente por el Dr. L. Calvinho, INTA Rafaela, Santa Fe, Argentina) que fueron aislados en el año 2005 (Tabla 3).

Tabla 1. Aislamientos de *S. aureus* NT epidemiológicamente no relacionados obtenidos de bovinos con mastitis.

Cepa	Fecha ^a	Región ^b	Genotipo ^c	Genes <i>cap</i> ^d	IS257/ <i>cap</i> ^e
MB 314	12/89	Las Heras, Buenos Aires	A1/I	5	+ (s)
MB 316	12/89	La Vacherie, Mendoza	A1/I	5	+ (s)
MB 319	02/90	Tandil, Buenos Aires	A1/I	5	-
MB 325	03/90	Bolívar, Buenos Aires	A1/I	no	+ (s)
MB 339	04/90	Las Heras, Buenos Aires	A1/I	5	-
MB 407	04/91	Luján, Buenos Aires	A1/I	5	-
MB 411	04/91	9 de Julio, Buenos Aires	A1/I	5	+ (s)
MBa 5	07/91	Ameghino, Buenos Aires	A1/I	5	-
MBb 028	05/92	Olavarría, Buenos Aires	A1/I	5	-
MBb 36	08/92	Luján, Buenos Aires	A1/I	5	-
MB 2-7109	11/95	Rafaela, Santa Fe	A1/I	5	-
MB 397	12/90	Rafaela, Santa Fe	A1/XII	5	-
MB 2-9320	10/95	Rafaela, Santa Fe	A10/VI	no	+
MB 308	11/89	Brandsen, Buenos Aires	A11/VII	no	+
MB 369	07/90	La Vacherie, Mendoza	A12/VI	5	-
MBb 23	04/92	Bolívar, Buenos Aires	A12/VI	no	+ (s)
MBZ 500	02/93	Gualeguaychú, Entre Ríos	A12/VI	no	+ (s)
MBZ 503	03/93	Luján, Buenos Aires	A12/VI	no	+ (s)
MBC 205	04/94	Tres Arroyos, Buenos Aires	A12/VI	no	+ (s)
MBC 207	05/94	La Vacherie, Mendoza	A12/VI	no	+ (s)
MBT 007	02/96	La Delia, Entre Ríos	A12/VI	no	+ (s)
MBT 001	02/96	Olavarría, Buenos Aires	A12/VI	no	+ (s)
MBT 002	02/96	Tandil, Buenos Aires	A12/VI	no	+ (s)
MBT 003	02/96	La Vacherie, Mendoza	A12/VI	5	-
MBT 019	04/96	Mercedes, Buenos Aires.	A12/VI	no	+ (s)
MBT 026	05/96	Lincoln, Buenos Aires	A12/VI	5	-
MBD 034	04/97	Gualeguaychú, Entre Ríos	A12/VI	no	+ (s)
MB 327	03/90	Olavarría, Buenos Aires	A12/VII	no	+
MB D014	03/97	Lincoln, Buenos Aires	A13/VI	no	+
MBC 204	04/94	Olavarría, Buenos Aires	A14/VI	no	+
MB 429AD	05/91	Brandsen, Buenos Aires	A14/VII	5	-
MBD 007	02/97	Gral. Rodríguez, Buenos Aires	A15/VI	no	+ (s)
MBC 214	07/94	Rafaela, Santa Fe	A16/VI	no	+
MB 099	11/89	Tres Arroyos, Buenos Aires	A2/VI	no	+
MB 100	11/89	La Vacherie, Mendoza	A3/I	5	-
MB 356	06/90	Las Heras, Buenos Aires	A4/I	5	+ (s)
MB 6-3-996	11/95	Rafaela, Santa Fe	A5/I	5	-
MBT 023	04/96	Rafaela, Santa Fe	A6/I	5	+ (s)
MB 328	03/90	9 de Julio, Buenos Aires	A7/VII	no	+
MBC 203	03/94	Lincoln, Buenos Aires	A8/VI	no	+ (s)
MB 2-1790	11/95	Rafaela, Santa Fe	A8/VII	no	+
MB 301	10/89	La Vacherie, Mendoza	A9/VI	no	+
MB 067	12/95	Basavilbaso, Entre Ríos	C1/VI	no	+
MB 101	11/89	Brandsen, Buenos Aires	D/XV	5	-

^aMes/año de aislamiento.

^bDistrito/Provincia de donde fue obtenida la muestra

^cPFGE / Ribotipificación (18).

^dAmplificación por PCR de los fragmentos específicos de los genes *cap5* o *cap 8*.

^ePresencia del elemento IS obtenido mediante amplificación por PCR. La ubicación de este elemento fue investigada en 11 aislamientos.

^f(s), El elemento IS fue secuenciado en estas cepas.

Tabla 2. Aislamientos de *S. aureus* capsulados pertenecientes a los

genotipos prevalentes

Cepa	Fecha ^a	Región ^b	Genotipo ^c	Expresión de PC ^d	Copias del elemento IS ^e
MB 113	04/90	Tres Arroyos, Buenos Aires	A1/I	5	2 (s) ^g
MB 304	10/89	Ameghino, Buenos Aires	A1/II	5	1
MB305	11/89	9 de Julio, Buenos Aires	A1/II	5	1
MB 337	04/90	La Vacherie, Mendoza	A1/II	5	0
MB 313	11/89	Brandsen, Buenos Aires	A1/III	5	1
MB 334	04/90	La Vacherie, Mendoza.	A1/III	5	1
MBa4	07/91	La Vacherie, Mendoza	A13/VI	8	0
MBC 212	06/94	Guauguaychu, Entre Ríos	A14/VI	8	1 (s) ^g
MB 094	11/89	Tandil, Buenos Aires	A17/VI	5	2 ^g
MBb13	03/92	Bolívar, Buenos Aires	A2/I	8	0
MB 008	05/94	Cañuelas, Buenos Aires	A2/I	8	0
MBb12	02/92	La Vacherie, Mendoza	A3/I	5	1
MB 311	11/89	Las Heras, Buenos Aires	A3/II	5	1
MBb18	03/92	Brandsen, Buenos Aires	A3/II	5	0
MB 019	06/94	Lujan, Buenos Aires	B3/V	8	0
MB 107	02/90	Bolívar, Buenos Aires	B3/XI	8	0
MBb19	03/92	Brandsen, Buenos Aires	B3/XI	8	0
MBb22	04/92	Bolívar, Buenos Aires	B3/XI	8	0
MB 018	06/94	Bolívar, Buenos Aires	B3/XI	8	0
MBa3	06/91	Basavilbaso, Entre Ríos	B4/VIII	5	0
MB 451	06/91	Tandil, Buenos Aires	C/IV	8	0
MB 361	06/90	La Vacherie, Mendoza	C1/I	5	1
MB 111	04/90	Lujan, Buenos Aires	D/XIII	5	0
MBb35	08/92	Lujan, Buenos Aires	D/XIII	5	0

^aMes/año de aislamiento.

^bDistrito/Provincia de donde fue obtenida la muestra

^cPFGE / Ribotipificación (18).

^dDeterminado por inmunodifusión.

^eDeterminado por "Southern blotting".

^f(s), El elemento IS fue secuenciado en estas cepas.

^gEn estas cepas se pudo detectar el elemento IS por PCR y por Southern Blot.

Las cepas Reynolds y Becker de *S. aureus* se utilizaron como cepas prototípicas de serotipo capsular 5 (Reynolds) y 8 (Becker), respectivamente. Como cepa prototípica de la delección de los genes *cap* y concomitante inserción del elemento *IScap*, se utilizó la cepa MBC204 (24). Para los estudios in vivo, se utilizaron las cepas isogénicas Reynolds (PC5), Reynolds (PC8) y Reynolds (PC-). En los estudios de enriquecimiento in vivo e in vitro se utilizaron las cepas bovinas RA9 (PC5+, *IScap*+) y la cepa RA18 (PC5+, *IScap*-), descritas en la Tabla 3. Los aislamientos estafilocócicos fueron conservados en 10% de leche a 80°C o en Caldo Cerebro-Corazón (BHI) con 20% de glicerol a -20°C. Las

cepas de *S. aureus* se cultivaron a 37 °C en Caldo Cerebro-Corazón (BHI) para la obtención de ADN cromosomal

Tabla 3. Aislamientos de *S. aureus* capsulados aislados en el período 2005

Cepa	Fenotipo	Localidad
RA1	NT	Rafaela, Santa Fe
RA2	NT	Rafaela, Santa Fe
RA3	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA4	PC8	Rafaela, Santa Fe
RA5	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA6	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA7	PC8	Rafaela, Santa Fe
RA8	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA9	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA10	PC8	Rafaela, Santa Fe
RA11	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA12	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA13	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA14	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA15	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA16	PC8	Rafaela, Santa Fe
RA17	NT	Rafaela, Santa Fe
RA18	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA19	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA20	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA21	PC5	Rafaela, Santa Fe
RA22	PC5	Rafaela, Santa Fe

2.3. EXTRACCION DE ADN CROMOSOMAL

Se utilizó el método del tiocianato de guanidinio (97), de acuerdo al siguiente protocolo:

- Inocular una colonia aislada en un tubo con 3ml de caldo BHI.
- Crecer la bacteria con agitación (130 rpm) durante toda la noche a 37°C.
- Centrifugar el cultivo a T amb. por 3 min. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el "pellet" en 100µl de "buffer" TE con pipeta o vórtex.
- Agregar 10µl de lisozima 50mg/ml (concentración final: 5mg/ml).
- Agregar 10µl de lisostafin (1mg/ml). Incubar 30 min. a 37°C en un baño de agua.
- Agregar 500µl de solución GES. Vortexear.
- Incubar 10min. a T amb. hasta observar lisis. Pasar los tubos al hielo.
- Agregar 250µl de ACONH₄ 7.5M. Mezclar por inversión. Incubar 10 min. en hielo.
- Agregar 500µl de cloroformo-isoamílico (24:1). Mezclar por inversión hasta que desaparezcan las dos fases.
- Centrifugar 10min. a 14000 r.p.m. a 4°C.
- Transferir aproximadamente 750µl de sobrenadante a un nuevo tubo.

- Agregar 0,54 volúmenes de isopropanol frío. Mezclar por inversión.
- Ver precipitar el ADN.
- Centrifugar los tubos a 14000 r.p.m. por 20 min. a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- Centrifugar nuevamente los tubos a 14000 r.p.m. durante 2 min. a 4°C.
- Sacar el resto de isopropanol.
- Agregar 500µl de etanol 70%. Invertir. Centrifugar 2 min. Sacar el sobrenadante. Repetir.
- Sacar completamente el etanol. Dejar secar en estufa a 37°C.
- Resuspender en 100µl de "buffer" TE o en H₂O.
- Guardar a 4°C hasta su lectura (si se resuspendió en TE) o a -20°C (si se resuspendió en H₂O).

2.4. EXTRACCION DE ARNm

Se realizó la extracción de ARN de acuerdo al siguiente protocolo:

- Partir de un cultivo "overnight". y ajustar a 10⁷-10⁸ UFC/ml.
- Centrifugar 3-5ml a 14000 rpm.
- Resuspender precipitado bacteriano en 100µl de TE pH8 + 10µl de lisozima 5mg/ml + 20µl de 1mg/ml de lisostafin.
- Incubar 30 min 37°C
- Agregar 350µl de buffer RA1 (lisis) + 3.5µl de b-mercaptoetanol y vortexear vigorosamente.
- Colocar el lisado en la unidad de filtrado y centrifugar 1min a 9000rpm.
- Agregar 350µl de etanol 70% T°amb. Vortexear suavemente.
- Centrifugar 30 seg 6500 rpm.
- Agregar 350µl MDB y centrifugar 1 min a 9000 rpm.
- Agregar la preparación en el centro de la sílica de la columna + 95µl de DNAasa reaction y dejar 15 min a T amb.
- 1er lavado: + 200µl de buffer RA2 y centrifugar 30 seg a 6500 rpm
- 2do lavado: + 600µl de buffer RA3 y centrifugar 2 min a 9000 rpm.
- 3er lavado: +250µl de buffer RA3 y centrifugar 2 min 9000 rpm.
- Eluir el RNA en 60µl de agua RNAasa free y centrifugar 9000 rpm por 1 min.
- Agregar 1.5µl de RNAsin e incubar 20 min a 37°C.
- Guardar a -70°C por largos períodos o a -20°C.

2.5. RT PCR

El ARNm obtenido fue convertido a ADN copia (ADNc) con el "kit" de Promega (Improm-II reverse transcriptase) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADNc, se realizó la PCR para amplificar el elemento IS de acuerdo al ciclo descrito más adelante (sección de PCRs). Estas reacciones se realizaron en 100µl de reacción con 2µl de templado. El control positivo fue la amplificación del 16S bacteriano.

En la RT-PCR se agregaron los tubos sin la enzima transcriptasa reversa a fin de determinar posibles contaminaciones con ADN.

2.6. SOUTHERN BLOT

El ADN proveniente de cada una de las cepas de *S. aureus* fue digerido con la enzima *HindIII* (Life Technologies, Gaithersburg, Md) y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. El ADN se transfirió luego a una membrana de nylon (Gene Screen; NEN Research Products, Boston, Mass.) e hibridizó con un fragmento interno del elemento *IScap*, amplificado de la cepa MBC204. Esta sonda sonda fue utilizada para la determinación del número de copias de dicho elemento en los aislamientos capsulados de *S. aureus*. La sonda de ADN fueron marcadas enzimáticamente con peroxidasa utilizando el kit comercial de marcación y detección ECL (Amersham Life Science). La hibridización, los lavados y la radioautografía se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.7. PCR

2.7.1. Identificación de *S. aureus*

La técnica de PCR específica para *S. aureus* fue realizada como la describieron Martineau y col. (75). En resumen, 150µl de ADN genómico fue transferido a un tubo de 0,2ml con 20µl de mezcla de PCR conteniendo 2,5mM MgCl₂, 0,4µM de cada uno de los dos cebadores específicos para *S. aureus* (Sa442-1 y Sa442-2), 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatados, y 0,5 U de ADN Taq polimerasa (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md). La PCR se realizó por 30 ciclos de 1s a 95°C para la etapa de desnaturalización y 30s a 55°C para la etapa de hibridización y extensión.

2.7.2. Cebadores

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio

Cebadores	Secuencia
<i>IScap-f</i>	5'- ACTTTGATACCTTGTCTTTC -3'
<i>IScap-r</i>	5'- GGTTCTGTTGCAAAGTT -3'
<i>adhE-f</i>	5'- CAGAGCTCGCATTGAAG -3'
<i>aldA-r</i>	5'- CTAATTGATCCTTACCAGTTTGACTACC -3'
<i>cap5H-f</i>	5'- CGATGAGGATCCCGATTG-3'
<i>cap5J-r</i>	5'- CATAGCCTAATAACGG-3'
<i>cap8H-f</i>	5'-GACGATGAGGGTACCGATTCTTG -3'
<i>cap8K-r</i>	5'-ACAATCACAGAAAGGCATGCCG-3'
<i>capA-r</i>	5'-GAGGATTGTCACCCTTAG-3'
<i>capO-f</i>	5'-CATTGTTTAGCTGTTGATCC-3'
<i>capP-f</i>	5'-AGGAACAGCCGGATATG-3'
<i>cap5P-r</i>	5'-GTGACGTAAAGGTACGAA-3'
<i>RNC-r</i>	5'-TTGGTTGAATTCCGATTGT-3'
<i>Sa442-1</i>	5'-AATCTTTGTTCGGTACACGATAT TCTTCACG-3'
<i>Sa442-2</i>	5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA-3'
<i>qacA/B-f</i>	5'-GCTGCATTTATGACAATGTTTG-3'
<i>qacA/B-r</i>	5'-AATCCCACCTACTAAAGCAG-3'
<i>qacE-f</i>	5'- AGCCCCATACCTACAAAGCC -3'
<i>qacE-r</i>	5'- GCGAAGTAATCGCAA CATCC -3'
<i>Smr-f</i>	5'-CTATGGCAATAGGAGATATGGTGT-3'
<i>Smr-r</i>	5'-CCACTACAGATTCTTCAGCTACATG -3'
<i>mecAU</i>	5'- AGTTGTAGTTGTCGGGTT -3'
<i>mecAL</i>	5'- TAGCAGTACCTGAGCCAT -3'

2.7.3. Detección de genes específicos del “cluster” *cap5* o *cap8*

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen total de 50 µl. Se utilizó en cada reacción 1-2 µg del ADN cromosomal en estudio. Como control positivo se utilizó ADN proveniente de las cepas Reynolds (PC5+) y Becker (PC8+). Como control negativo se utilizó ADN de la cepa *S. aureus* MBC204 que carece del “cluster” *cap5* (8) (determinado por Southern blot). Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf en las condiciones que se describen a continuación.

PCR para amplificar *cap5G-J* (tamaño del fragmento: 2,6 kb).

Reactivo	Final				
DNTPs	0,5mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a	94°C	} x 35
MgCl	4mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a	94°C	
<i>cap5H-f</i>	1µM	Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a	42°C	
<i>cap5J-r</i>	1µM	Síntesis de ADN	4 min. a	72°C	
Taq	2U	Elongación de cadenas	10 min. a	72°C	

PCR para amplificar *cap8H-K* (tamaño del fragmento: 4 kb)

Reactivo	Final				
DNTPs	0,5mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a	94°C	} x 35
MgCl	4mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a	94°C	
<i>cap8H-f</i>	1µM	Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a	56°C	
<i>cap8K-r</i>	1µM	Síntesis de ADN	5 min. a	72°C	
Taq	2U	Elongación de cadenas	10 min. a	72°C	

2.7.4. Obtención del fragmento de ADN ubicado entre los genes *adhE* y *aldA*

La amplificación se realizó utilizando los cebadores *adhE-f* y *aldA-r*. Las condiciones se determinaron utilizando la cepa MBC204 de *S. aureus* como control positivo. La cepa Reynolds fue utilizada como control negativo ya que carece de esta delección y el tamaño del "cluster" es de 17kb, lo que no permite su amplificación por esta PCR.

PCR para amplificar el fragmento *adhE - aldA*: (tamaño del fragmento: 4 kb).

Reactivo	Final				
DNTPs	0,5mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a	94°C	} x 30
MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a	94°C	
<i>adhE-f</i>	1µM	Pegado de los oligonucleótidos	4 min. a	69°C	
<i>aldA-r</i>	1µM	y Síntesis de ADN			
Taq	3U	Elongación de cadenas	10 min. a	72°C	

2.7.5. Detección del elemento IS

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50µl. Se utilizó en cada reacción 1-2µg del ADN cromosomal en estudio. Como control positivo se utilizó ADN proveniente de la cepa MBC204 (*IScap*⁺) y como control negativo se utilizó ADN proveniente de la cepa RN4220, que carece de elementos de inserción. Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf en las condiciones que se describen a continuación.

PCR para amplificar el elemento IS : (tamaño del fragmento a amplificar: 600pb (*IScap*, *IS257*), 790pb (elementos de inserción en cepas PC8 +))

<u>Reactivo</u>	<u>Final</u>				
DNTPs	0,2mM	Desnaturalización del ADN	5	min. a 94°C] x 35
MgCl	3mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 94°C	
<i>IScap-f</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	1	min. a 52°C	
<i>IScap-r</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	1	min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10	min. a 72° C	

2.7.6. Ubicación del elemento *IScap* en cepas *cap5(8)IScap*⁺

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50µl. Se utilizó en cada reacción 1-2µg del ADN cromosomal en estudio. En los casos en que resultó apropiado, se utilizó como control positivo ADN proveniente de la cepa MBC204 (*IScap*⁺). Como control negativo se utilizó ADN proveniente de la cepa RN4220 (sin elementos ISs). Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf en las condiciones que se describen a continuación.

PCR de ubicación de *IScap* con respecto al gen *adhE* (tamaño del fragmento: 943pb)

<u>Reactivo</u>	<u>Final</u>			
DNTPs	0,3mM	Desnaturalización del ADN	5	min. a 94°C

MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C] x 35
<i>adhE</i> - f	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 53,5°C	
<i>IScap</i> - r	0,5µM	Síntesis de ADN	1 min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10 min. a 72°C	

PCR de ubicación de *IScap* con respecto al gen *aldA* (tamaño del fragmento: 940 pb).

Reactivo	Final			
DNTPs	0,3mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C] x 35
MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	
<i>IScap</i> - f	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 49°C	
RNC-r	0,5µM	Síntesis de ADN	1 min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10 min. a 72°C	

PCR de ubicación de *IScap* antes del extremo 3' de *cap5(8)P* (tamaño: 737 pb)

Reactivo	Final			
DNTPs	0,3mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C] x 35
MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	
<i>IScap</i> -f	1µM	Pegado de los oligonucleótidos	1 min. a 50°C	
<i>cap5P-r</i>	1µM	Síntesis de ADN	1,5 min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10 min. a 72°C	

2.7.7. Búsqueda de elementos IS dentro del "cluster" *cap*

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50µl. Se utilizó en cada reacción 1-2µg del ADN cromosomal en estudio. En los casos en que resultó apropiado, se utilizó como control positivo ADN proveniente de la cepa Reynolds (PC5+). En estas reacciones se observó si existía un aumento de aproximadamente 700pb en el tamaño del fragmento observado en las cepas analizadas con respecto a la cepa control Reynolds. Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf en las condiciones que se describen a continuación.

PCR de ubicación de *IScap* entre el gen *adhE* y *cap5(8)A* (tamaño del fragmento: 627pb, tamaño esperado con *IScap*: 1327pb)

Reactivo	Final		
DNTPs	0,3mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C

MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C] x 35
<i>adhE- f</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	30 seg. a 50°C	
<i>capA-r</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	2 min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10 min. a 72°C	

PCR de ubicación de IS*cap* entre el gen *cap5(8)O* y *AldA* (tamaño del fragmento: 3939pb, tamaño esperado con IS*cap*: 4639pb).

Reactivo	Final			
DNTPs	0,3mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C] x 35
MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	
<i>capO-f</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	30 seg. a 50°C	
<i>AldA-r</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	5 min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10 min. a 72°C	

PCR de ubicación de IS*cap* entre el gen *cap5(8)O* y la región no codificante (RNC) que se encuentra corriente arriba del gen *AldA* (tamaño del fragmento: 1888pb, tamaño esperado con IS*cap*: 2588pb).

Reactivo	Final			
DNTPs	0,3mM	Desnaturalización del ADN	5 min. a 94°C] x 35
MgCl	2,5mM	Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	
<i>capO-f</i>	1µM	Pegado de los oligonucleótidos	30 seg. a 50°C	
<i>RNC-r</i>	1µM	Síntesis de ADN	3 min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10 min. a 72°C	

2.7.8. Detección de genes *qacA/B*, *qacE* y *qacC* (*smr*)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50µl. Se utilizó en cada reacción 1-2µg del ADN cromosomal en estudio. Como control positivo se utilizó ADN proveniente de la cepa Mu50 (*qacA/B*+, *smr*+) y como control negativo se utilizó ADN proveniente de la cepa RN4220, que carece de éstos genes. Para el gen *qacE*, se utilizó como control positivo un aislamiento clínico de *E. coli qacE*+ provisto gentilmente por la Lic. Soledad Ramírez (Facultad de Medicina, UBA). Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf en las condiciones que se describen a continuación.

PCR para amplificar los genes *qacA/B* (630pb).

Reactivo	Final				
DNTPs	0,2mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 95°C] x 30
MgCl	3mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 95°C	
<i>Qac A/B-f</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	30	seg. a 40°C	
<i>Qac A/B-r</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	1	min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10	min. a 72° C	

PCR para amplificar los genes *qacE* (220pb)

Reactivo	Final				
DNTPs	0,2mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 95°C] x 30
MgCl	3mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 95°C	
<i>Qac E-f</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	30	seg. a 40°C	
<i>Qac E-r</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	1	min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10	min. a 72° C	

PCR para amplificar los genes *qacC* (417pb)

Reactivo	Final				
DNTPs	0,2mM	Desnaturalización del ADN	3	min. a 94°C] x 35
MgCl	3mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 95°C	
<i>Smr-f</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	1	min. a 60°C	
<i>Smr-r</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	1	min. a 72°C	
Taq	1U	Elongación de cadenas	10	min. a 72° C	

2.7.9. Detección de genes *mecA*

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50µl. Se utilizó en cada reacción 1-2µg del ADN cromosomal en estudio. Como control positivo se utilizó ADN proveniente de la cepa N315 (*mecA*⁺) y como control negativo se utilizó ADN proveniente de la cepa RN4220, que carece de éstos genes. Las reacciones se realizaron en un termociclador Eppendorf en las condiciones que se describen a continuación.

PCR para amplificar los genes *mecA* (1011pb)

Reactivo	Final				
DNTPs	0,2mM	Desnaturalización del ADN	5	min. a 94°C] x 40
MgCl	3mM	Desnaturalización del ADN	1	min. a 95°C	
<i>mecAU</i>	0,5µM	Pegado de los oligonucleótidos	1	min. a 50°C	
<i>mecAL</i>	0,5µM	Síntesis de ADN	2	min. a 72°C	

<u>Taq</u>	<u>1U</u>	Elongación de cadenas	10 min. a 72° C
------------	-----------	-----------------------	-----------------

2.8. VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR EN GELES DE AGAROSA

Alícuotas de cada reacción de PCR (5-10µl) fueron analizadas en geles de agarosa al 0.8%, 1% o 1.5% de acuerdo al tamaño del fragmento de ADN amplificado, en TBE 1X conteniendo 1µl de bromuro de etidio (10mg/ml). La corrida se realizó en “buffer” TBE 1X a 80V. Para la determinación del tamaño de los insertos amplificados, se utilizó el marcador de tamaño molecular “1Kb ladder” (Promega, Madison, WI).

2.9. SECUENCIACION DEL FRAGMENTO DE ADN UBICADO ENTRE LOS GENES *adhE* y *aldA*

Los productos de amplificación fueron secuenciados mediante el equipo ABI PRISM® 373 DNA sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

2.9.1. Purificación del producto de PCR

Se utilizó el “kit” QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Ca.) de acuerdo a las instrucciones de fabricante.

2.9.2. Análisis de los resultados obtenidos

La secuencia obtenida se comparó con las secuencias disponibles en el Genbank y se estableció la homología a nivel de ADN y proteínas con secuencias de genes conocidos.

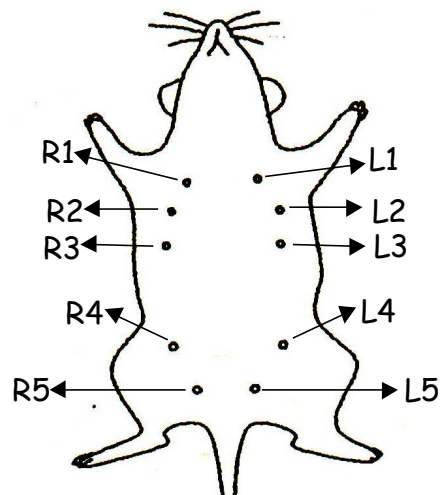
2.10. DETECCIÓN DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS *S. aureus*

Para determinar la resistencia a oxacilina, aminoglucósidos y trimetoprima; se utilizó el método de difusión en placa de Müller-Hinton descrito en trabajos anteriores (5).

2.11. MODELO MURINO EXPERIMENTAL DE MASTITIS

En estos experimentos se utilizaron 3 cepas isogénicas de *S. aureus* obtenidas previamente por la Dra. Jean Lee (Channing Laboratory, BWH, Harvard University). Estas cepas son: Reynolds (PC5), Reynolds (PC8) y Reynolds (PC-). El modelo de inoculación intramamaria ha sido descrito anteriormente (38). Para el modelo de mastitis bovina se utilizaron ratones preñados CF-1 de 6 a 8 semanas de edad. Los animales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y se mantuvieron bajo condiciones definidas previamente. Diez días después de parir, las hembras madres fueron separadas de sus crías y anestesiadas con ketamina (60mg/kg) (Ketalar, Parke Davis) y xilacina (5mg/kg) (Rompun, Bayer). Luego, se inocularon con 50µl de una suspensión de *S. aureus* que contenía entre 10^5 y 10^6 UFC/ml de *S. aureus* Reynolds (PC5), Reynolds (PC8) o Reynolds (PC-). Esta suspensión fue inoculada dentro de las glándulas número cuatro a ambos lados (L4 izquierda y R4 derecha) (ver esquema 1). Después de las dos horas post-inoculación, las hembras fueron retornadas a la jaula con sus respectivas crías. A diferentes tiempos (1, 4, 8 y 12 días) después de la inoculación, las ratonas

fueron sacrificadas. Las glándulas infectadas fueron removidas quirúrgicamente, homogenizadas en 2 ml de TSB (caldo de tripteína de soya) y se sembraron diluciones seriadas de los homogenatos en placas de agar TSA (agar de tripteína de soya) para recuento cuantitativo. A partir de las UFC desarrolladas se calculó el número total de UFC recuperadas de cada glándula a cada uno de los tiempos analizados. Los experimentos de inóculos mixtos fueron realizados entre dos cepas una capsulada Reynolds (PC5) o (PC8) y la cepa acapsulada Reynolds (PC-) en una proporción 1:1 en un inóculo de 10^6 UFC/glándula. Las colonias Reynolds (PC-) fueron identificadas por réplica en una placa con TSA-5 μ g/ml de eritromicina, y las cepas capsuladas fueron identificadas por la técnica de “colony immunobloting” (Lee, 1990).



Esquema 1. Ubicación de las glándulas mamarias en el ratón.

2.12. HISTOPATOLOGIA DE LOS PREPARADOS DE GLANDULA MAMARIA

En experimentos separados, las glándulas mamarias L4 y R4 fueron removidas quirúrgicamente para la examinación histológica. La glándula completa fue fijada en formalina al 5%, deshidratada con etanol 70% a 100%, aclarado con xileno y embebido en parafina. Las secciones de tejido fueron teñidas con hematoxilina y eosina, PAS y coloración tricrómica utilizando técnicas de tinción de rutina. Para cuantificar las alteraciones de la histología de la glándula mamaria, se determinó un índice de acuerdo

a: (1) infiltración media de PMN en áreas aisladas de secciones de tejidos, epitelio tubular no dañado. (2) infiltración intersticial en la mayoría de los campos observados, áreas dispersas de tejido dañado con pérdida de la estructura tisular y la observación de algunos abscesos. (3) infiltración severa que involucra a la mayoría de los campos, frecuentes áreas de tejido dañado con pérdida de la estructura tisular e imágenes frecuentes de áreas con formación de abscesos. Los valores individuales fueron aplicados a cada glándula mamaria removida en los días 4, 8 o 12.

2.13. ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la línea establecida de células epiteliales de glándula mamaria bovina MAC-T (gentilmente cedida por Nicolás Léeme, Nexia Biotechnologies Inc., Montreal, Canadá). El medio empleado para su crecimiento fue DMEM con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 5 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de hidrocortisona, 44 mM de NaHCO₃, 100U/ml de gentamicina y 100µg/ml de sulfato de estreptomicina. Antes de cada experimento, se sembraron 6x10⁴ cél/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y se crecieron durante 3 días a 37°C con 5% de CO₂ (55). La monocapa de células MAC-T crecidas en confluencia (aprox. 1,25 x 10⁵ células por pocillo) se infectó con una suspensión de *S. aureus* (moi~15-20) luego de ser lavadas con buffer salino de fosfato (PBS) y resuspendidas en 1ml de medio DMEM fresco. Transcurrida 1 h de incubación a 37°C con 5% CO₂, se realizaron 4 lavados con PBS para descartar la bacteria extracelular no adherida y se agregó medio DMEM con 100µg/ml de gentamicina (Sigma) a cada pocillo. Luego de la incubación de 2 ó 24hs a 37°C con 5% CO₂, se descartaron los sobrenadantes de los co-cultivos y se lavaron las monocapas con PBS. Las células se trataron con 100µl de tripsina 0.25%-EDTA 0.1% en DMEM durante 5 min a 37°C y se lisaron para exponer los estafilococos intracelulares por el agregado de 900µl de Tritón X-100 0.025% en agua destilada. Los lisados celulares se diluyeron serialmente y se

sembraron en placas de TSA para cuantificar las UFC/pocillo de *S. aureus* intracelular viable.

2.14. EXPERIMENTOS DE ENRIQUECIMIENTO EN CEPAS *S. aureus* NT IN VITRO

Para realizar estos experimentos, se utilizó un antisuero contra PC5 obtenido mediante la inmunización de conejos con la cepa *S. aureus* Reynolds muerta y posterior adsorción del suero hiperinmune con mutantes no capsulados, como se describió anteriormente (69). En éstos ensayos se utilizaron los aislamientos bovinos de *S. aureus* RA9 [*I*Scap(e)+; PC5+], y como control la cepa RA18 [*I*Scap-; PC5+], descritas anteriormente. Ambas cepas bacterianas fueron cultivadas en 10ml de caldo Columbia + 2% NaCl (CCS). Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados y lavados con buffer fosfato 0.01M, 0.15M NaCl (PBS). El precipitado obtenido (“pellet”) fue suspendido en 800µl de antisuero PC5 o suero no inmune normal de conejo (control) e incubado por 4 h a 4°C. La suspensión bacteriana fue centrifugada 17,000 x g por 10 min. Diez microlitros del sobrenadante fue subcultivado en 10ml de CCS durante toda la noche, y la bacteria fue nuevamente centrifugada e incubada con el antisuero de conejo, como se ha descrito. El resto del sobrenadante, fue sembrado cuantitativamente en agar tripteína de soya (TSA) para la realización del “colony immunoblot”. Este ciclo fue repetido 10 veces. La expresión de PC5 se realizó sobre placas de TSA, que contenían entre 30-150 colonias, mediante la técnica de “colony immunoblot” (69). Los aislamientos que no reaccionaron con el antisuero anti-PC5, fueron ensayados mediante un método más sensible de inmunodifusión (119).

2.15. EXPERIMENTOS DE ENRIQUECIMIENTO EN CEPAS *S.aureus* NT IN VIVO

Para estos ensayos, se utilizó una variante del modelo de mastitis murina descrito anteriormente. Se inmunizaron grupos de ratones CF-1 de 6 a 8 semanas de edad a los 10 días del nacimiento de las crías por la ruta intraperitoneal (*ip*) con anticuerpo anti-PC5 o anti-PC8 o suero no inmune (control). Los animales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y se mantuvieron bajo condiciones definidas previamente. A las 24hs post inmunización, los ratones fueron separadas de sus crías, anestesiadas con ketamina (60mg/kg) (Ketalar, Parke Davis) y xilazina (5mg/kg) (Rompun, Bayer) e inoculados con una dosis de 1×10^6 UFC/mama por la ruta intramamaria (*ima*) con la cepa RA9 (PC5) o MBC212 (PC8). A las 96hs, los ratones fueron sacrificados, se removieron quirúrgicamente las mamas L4 y R4, se homogenizaron y se realizaron recuentos bacteriológicos en TSA.

2.16. MODELO DE BACTEREMIA MURINA POR *S. aureus*

Para determinar la posible reversión de cepas NT obtenidas del experimento anterior a cepas capsuladas, se realizó un modelo de bacteriemia murina. Grupos de ratones hembra CF-1 de 6 a 8 semanas de edad, fueron inoculados con una dosis de 1×10^8 UFC/0.2ml por ruta *ip*. Los animales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y se mantuvieron bajo condiciones definidas previamente. A las 24 hs, se realizó la punción cardíaca a fin de obtener el contenido sanguíneo de los mismos. Para ello, los animales fueron anestesiados con ketamina (60mg/kg) (Ketalar, Parke Davis) y xilazina (5mg/kg) (Rompun, Bayer). Luego se ubicó al animal con el dorso apoyado sobre la mesa operatoria, accediendo al corazón por debajo del esternón. En esta modalidad, se insertó una aguja larga (4-5 cm y 23-21G) detrás de la apófisis xifoides del esternón,

situada a la altura del estómago y en dirección caudo-craneal. De este modo, la aguja sigue un plano paralelo a las cavidades cardíacas. A medida que avanza la aguja, se ejerce una débil presión negativa, retirando el émbolo de la jeringa hasta que aparece sangre en la misma. Luego, los animales fueron sacrificados y la sangre fue cultivada cuantitativamente en placas de TSA para determinar la expresión de cápsula mediante “colony immunoblot” y detectar posibles revertantes capsulados.

2.17. ANALISIS DE PRODUCCION DE HEMOLISINAS α Y β POR *S. aureus*

La producción de α y β hemolisinas por *S. aureus* fue determinada por el cultivo de las distintas cepas en agar sangre de conejo (α -hemólisis) y agar sangre de carnero (β -hemólisis). Las cepas positivas se determinan por la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia por lo que se demuestra que el microorganismo es hemolítico. En esta especie en concreto la destrucción de los hematíes se debe a la existencia en el microorganismo de hemolisinas que lisan completamente los glóbulos rojos.

2.18. CONSIDERACIONES ESTADISTICAS

El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-whitney del paquete estadístico GraphPad InStat. Los resultados cuantitativos de los cultivos obtenidos de los animales infectados con *S. aureus* fueron comparados por ANOVA con un análisis posterior por el test de Turkey-Kramer. Los datos de cultivos celulares fueron analizados por el test de t de Student.

2.19. DEFINICIONES

Con el fin de clarificar los conceptos descriptos en éste trabajo, se definen a continuación los términos utilizados en el texto **IS257**: es el elemento de inserción con 99-100% de identidad de secuencia con el fragmento equivalente descrito para la cepa *S. aureus* N315 (65). **IScap**: es el elemento de inserción que reemplazó el locus *cap5(8)* en la cepa bovina *S. aureus* MBC204 (24). *IScap* se ha encontrado dentro del locus *cap* [interna, **IScap(i)**] o externa al locus *cap5(8)* intacto [**IScap(e)**]. Cuando los elementos de inserción fueron identificados por amplificación utilizando los cebadores comunes a *IS257* e *IScap*, el amplicón fue denominado “**elemento IS**” para eliminar cualquier tipo de confusión en el texto. Cuando el elemento *IS* fue identificado positivamente por secuenciación o se refiere en forma particular al tipo de *IS*, éste fue denominado **IScap** o **IS257**. **cap5+** o **cap8+**: indica que en las cepas de *S. aureus* analizada se amplificó los genes específicos de cada serotipo con los cebadores *cap5G-K* (serotipo capsular 5) o *cap8H-K* (serotipo capsular 8). Las cepas NT *S. aureus* que mostraron amplificación positiva para *cap5+* o *cap8+* no contenían al elemento *IScap* dentro de la región *cap5(8)*.

Resultados

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

En base a los resultados de nuestro laboratorio, se observa que existe una alta prevalencia de cepas NT en muchos países y especialmente en Argentina en aislamientos provenientes de leche de bovinos con mastitis, acompañados de una baja prevalencia de cepas capsuladas. Por lo tanto, en primer lugar se investigó la prevalencia de cepas de *S. aureus* de Argentina que poseen IS257 o IS*Scap*.

En primer lugar, se estudió un grupo de 68 aislamientos epidemiológicamente no relacionados, entre los que 44 de éstos eran NT, 14 expresaban PC5 y 10 PC8, determinado por inmunodifusión. Para establecer la prevalencia de aislamientos que poseían un elemento de inserción de la familia IS6 (IS257 o IS*Scap*), se realizó una amplificación por PCR de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos sobre el grupo seleccionado de 68 aislamientos. Los cebadores utilizados fueron diseñados de tal manera de poder amplificar tanto IS257, IS*Scap* (e), IS*Scap* (i), IS431 como ISRF122. Estos elementos pertenecen a la familia IS6 y han sido descritos en otras cepas estafilocócicas, con excepción del elemento IS*Scap*. La posición de éstos elementos de inserción en los genomas de *S. aureus* y la longitud del amplicón obtenido de los mismos utilizando los cebadores IS*Scap*-f e IS*Scap*-r, se describe en la Tabla 5. El elemento de inserción (IS) fue hallado mediante amplificación por PCR en el 47% de los 68 aislamientos (capsuladas como NT) produciendo un amplicón de 600-800pb con los cebadores descriptos. El análisis de secuencia de los diferentes amplicones se describe más adelante. En 7 cepas PC5 que exhibieron amplificación por PCR negativa con los cebadores descriptos, se detectó hibridización positiva para el elemento IS mediante Southern Blot (Tabla 2), dando por resultado un total de 39/68 (57%) de cepas que contenían el elemento IS. Paralelamente, en 22 aislamientos obtenidos más recientemente (2004-2005) de una única subregión (ver Tabla 3), se ha amplificado ésta secuencia de inserción en 15 de 22 aislamientos, que corresponde a un 68%. Estos

resultados, permitieron concluir que este elemento IS se encuentra en alta proporción en aislamientos bovinos de *S. aureus*.

El grupo de genes que componen el “cluster” *cap* se encuentra delimitado corriente arriba por el gen “housekeeping” *adhE* (alcohol-acetaldehído dehidrogenasa) y, corriente abajo, por el gen “housekeeping” *aldA* (gen homólogo a la aldehído dehidrogenasa). De acuerdo a trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha determinado que esta secuencia de inserción podría estar involucrada en la pérdida de los genes *cap*, conservando la presencia de éstos genes “housekeeping”. A fin de determinar si esta deleción se encontraba en ésta población de estudio, se analizaron por PCR los 44 aislamientos NT del grupo de cepas en investigación. El 55% (24/44) de las cepas NT analizadas, exhibieron amplificación positiva para el elemento de inserción y amplificación negativa para los genes específicos *cap5* y *cap8* (Tabla 1), sugiriendo una estructura del locus *cap* similar a la cepa prototípica MBC204. En base a éstos resultados, se realizó una PCR entre los genes “housekeeping” *adhE* y *aldA*, mediante la utilización de los cebadores que hibridaban con el extremo 5' del gen *adhE* (*adhE-f*) y con el extremo 3' del gen *aldA* (*aldA-r*) en estas 24 cepas (Figura 1).

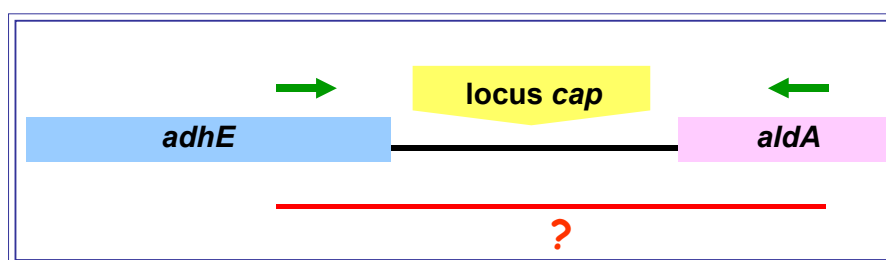


Figura 1. Ubicación de los cebadores utilizados para amplificar la región de ADN cromosomal entre los genes *adhE* y *aldA*

Estos 24 aislamientos resultaron positivos para la amplificación de un fragmento de 4kb correspondiente a la presencia del elemento de inserción dentro del “locus” *cap*, reemplazando a éste. Luego se realizaron diferentes PCRs confirmatorias a fin de

obtener la secuenciación del amplicón de 4kb. Los 3 pares de cebadores utilizados fueron diseñados en base a los resultados obtenidos previamente por secuencia del locus *cap* en dos cepas prototípicas *cap5(8)*-IScap+ (MBC 204 y MB214) (Figuras 2 y 3). El primero de los pares contenía cebadores que hibridizaban con el extremo 3' del gen *adhE* (*adhE*-f, Tabla 4) y con el extremo 3' del elemento IS (IScap-r, Tabla 4) (flechas rojas, PCR 1). Mediante esta PCR, la obtención de un producto de 943 pb confirmaría que el elemento de inserción está ubicado corriente abajo del gen *adhE*. El segundo par contenía cebadores que hibridizaban con el extremo 5' del elemento IS (IScap-f, Tabla 4) y con la región no codificante entre el gen *cap5(8)P* y el gen *aldA* (*RNC*-r, Tabla 4) (flechas azules, PCR 2). Mediante esta PCR, la obtención de un producto de 940 pb confirmaría que el elemento IS está ubicado corriente arriba del gen *aldA*. El tercer par incluyó cebadores que hibridizaban con el extremo 5' el elemento IS (IScap-f, Tabla 4) y con el extremo 3' el gen *cap5P* (*cap5P*-r, Tabla 4) (flechas verdes, PCR 3). Mediante esta PCR, la obtención de un producto de 737 pb confirmaría que el elemento IScap se encuentra ubicado adyacente a los últimos 60 pares de bases del gen *cap5P*. En las 24 cepas analizadas se obtuvieron los amplicones esperados, sugiriendo que el elemento IS en estas cepas se ubicaba en el mismo sitio que la cepa prototípica MBC204 (entre el gen *adhE* y la región no codificante corriente arriba del gen *aldA*), presentando la delección de los genes *cap* mediante IScap. Estos amplicones fueron secuenciados en 11 de las 24 cepas analizadas y todas las secuencias mostraron una identidad del 100% con las secuencias equivalentes de *S. aureus* MBC204. Por ese motivo, este elemento de inserción fue definido como IScap

Tabla 5. Posición (“locus tag”) dentro de los genomas secuenciados y longitud del amplicón esperado para cada elemento de inserción de la familia IS6 mencionada o investigada en éste trabajo.

Genoma	Elemento de inserción	Posición	Referencia
<i>S. aureus</i> RF-122	ISRF-122 ISRF-122	SAB0902C SAB1299	50
<i>S. aureus</i> NT315	IS257/IS431 IS431 <i>mec</i>	SA0026 SA0034	65
<i>S. aureus</i> MRSA-252	IS257/IS431 IS257/IS431 IS257/IS431 IS257/IS431 IS431 <i>mec</i>	SAR0027 SAR0034 SAR0685 SAR0686 SAR0726	53
<i>S. aureus</i> cepa clínica TY4 que contiene EDIN-C	ORF49	Genoma no secuenciado	135
<i>S. aureus</i> MBC204 (cepa clínica bovina)	IS <i>Scap(i)</i>	Genoma no secuenciado	Este trabajo
<i>S. aureus</i> RA9 (cepa clínica bovina)	IS <i>Scap(e)</i>	Genoma no secuenciado	Este trabajo
<i>S. aureus</i> MBC212 (cepa clínica bovina)	IS257	Genoma no secuenciado	Este trabajo

^a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=82749777>

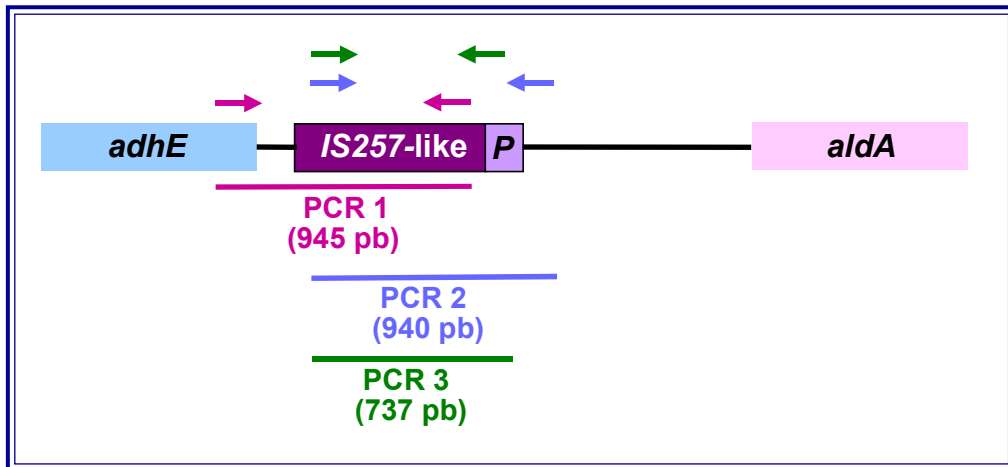


Figura 2. Ubicación de los cebadores utilizados para determinar la localización del elemento *IScap* en cepas *cap5* (δ)*IScap*⁺.

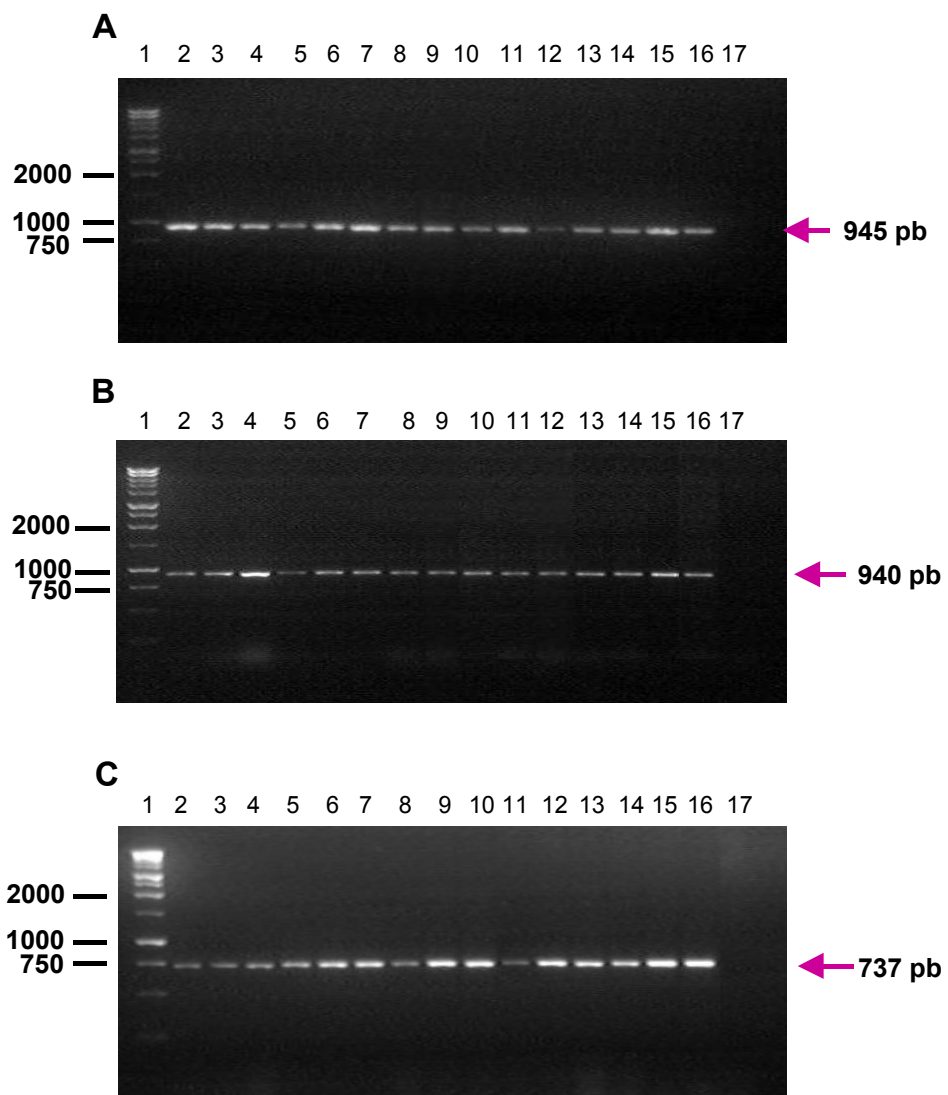


Figura 3. Ubicación del elemento IScap en *S. aureus* NT *cap5(8)*-IScap⁺. A: PCR1. B: PCR2. C: PCR3. Calles 2-15: *S. aureus* NT MB325, MBT019, MBb23, MBT001, MBC205, MBD034, MBZ500, MBT002, MBW8, MBZ503, MBT008, MBT027, MBC207, MBT007; calle 16: *S. aureus* MBC204 (*cap5(8)*-IScap⁺), calle 17: *S. aureus* RN4220 (*cap5*⁺).

3.1.1. Conclusiones parciales

Estos resultados permitieron demostrar que un 55% de las cepas NT carecían del “cluster” *cap5(8)*, contenían la IScap, y el reordenamiento genético fue idéntico al observado en las cepas prototípicas. Este resultado sugiere que las cepas prototípicas no mostraban un hecho aislado sino que ese reordenamiento se repetía en cepas epidemiológicamente no relacionadas y que fue seleccionado positivamente, quizás por encontrarse asociado a cierta ventaja adaptativa para la bacteria. De hecho, estas cepas pertenecen a uno de los subclones más prevalentes de nuestro país.

3.2. ESTUDIO DE IScap: SECUENCIA Y FUNCIONALIDAD DE LA TRANSPOSASA

3.2.1. Análisis de la secuencia obtenida por la amplificación del elemento IS en cepas NT y *cap5(8)*

Para el análisis específico de la secuencia del elemento IS, se realizó una amplificación por PCR mediante los cebadores *IScap-f* e *IScap-r* del gen de la transposasa del elemento IS en 20 cepas, 18 cepas NT [Tabla 1 indicadas con (s)] y 2 cepas PC5+ [Tabla 2 indicadas con (s)] que contienen una o más copias del elemento IS. La secuencia de las inversiones repetidas fue obtenida de la amplificación de las regiones entre *IScap* y regiones flanqueantes de ADN mediante los cebadores *adhE-f* e *IScap-r* (región corriente arriba del elemento de inserción, 945pb); e *IScap-r* y *RNC-r* (región corriente arriba del elemento de inserción, 940pb). Todos los amplicones fueron secuenciados, y las secuencias aminoacídicas obtenidas fueron comparadas entre sí mediante el programa Blast (Figura 4). El elemento de inserción encontrado pertenecería a la familia IS6 de acuerdo al tamaño, a las secuencias invertidas repetidas presentes en sus extremos y a la secuencia y ubicación de su motivo DDE (dominio conservado ubicado dentro de la tríada que conforma el sitio catalítico de la transposasa) (45,74), al igual que las cepas prototípicas MBC204 y MBC214. Sólo la cepa MB113 contenía dos copias del elemento IS (Tabla 2, determinado por Southern Blot). El análisis de la secuencia de ambas hebras (fw y rev) no mostraron discrepancias en el cromatograma, indicando que ambas copias eran idénticas (ambas *IScap(e)*, ver más adelante). El elemento de inserción encontrado contenía 2 secuencias repetitivas invertidas de 23 pb y un marco abierto de lectura (ORF) de 675 pb que codificaba para una proteína probable de 224 aminoácidos (Figuras 4 y 5). Tanto *IScap* como *IS257* comparten 13pb con los otros elementos de inserción descritos en la Figura 5 pertenecientes a la familia IS6.

Con las secuencias obtenidas del elemento de inserción de los 20 aislamientos, se realizó un estudio de distancias filogenéticas de las secuencias aminoacídicas de las transposasas pertenecientes a la familia IS6 con respecto a la secuencia de la *IScap* (Figura 6). Este árbol fue realizado con el programa Phylip y se realizaron 1000 repeticiones. En el mismo, puede verse que, aparentemente, la *ISRF122* descrita es el antecesor común a las secuencias de inserción estudiadas de la familia IS6. En la

evolución de ésta secuencia de inserción aparecieron dos ramas: una originada por los elementos de inserción relacionados con IS257 y otra rama originada por los elementos de inserción relacionados con el orf49 reportado por Yamaguchi, en donde se encuentran ambas variantes del elemento *IScap*. Al mismo tiempo, puede observarse que la rama originada por orf49 engloba a los elementos hallados en bovinos, mientras que la otra rama se relaciona mayormente con elementos de inserción hallados en aislamientos humanos de *S. aureus*. Este hecho podría sugerir que la adquisición de estos elementos de inserción podría tener relación con el tipo de huésped involucrado y la adaptación al mismo. Las variantes externa [*IScap(e)*] e interna [*IScap(i)*] (ver definición más abajo) de la *IScap* aparecen a la misma altura, lo que sugiere que los clones que portan el elemento de inserción fuera del locus *cap* o reemplazando a éste, conviven en el mismo tiempo evolutivo. Por lo tanto, la transferencia horizontal entre estas cepas es muy factible pudiendo originar el pasaje de una cepa PC+ IS+ a una cepa NT IS+.

```

IScap(i)      MNYFRYKQFDKDVITVAVGYYLRYALSARNISEILREIRGIY
IScap(e)      .....
IS257a       .....N.....D.....G...VN
IS257b       .....N.....D.....VN
IS431         .....N.....T.....D.....VN
ORF49         .....D.....
ISRF122       .....N.....D.....VN

```

```

                                     N2
IScap(i)      VHHSTIYRWVQYAPILYQIWKKKNKQAYYKWHIDETVYIKI
IScap(e)      .....Y.....
IS257a       .....V.....H.K.....R.....
IS257b       .....V.....H.K.....R.....
IS431         .....V.....H.K.....R.....
ORF49         .....
ISRF122       .....V.....R..K.....

```

```

IScap(i)      KGQWHYLYRAIDANGHTLDISLRKKRDNHSAYTFIERLIQ
IScap(e)      .....D.....
IS257a       ..K.S.....E.....W..Q.....A..K.....
IS257b       ..K.N.....E.....W..Q.....A..K.....
IS431         ..K.S.....E.....W..Q.....A..K.....
ORF49         .....D.....K.....
ISRF122       ..K.N.....E.....H.W..Q.....A..K.....

```

```

                                     N3                                     C1----
IScap(i)      FGKPMIITDQAPSTKVAMTKIVKVFKLNPNCCHCTSKYLNN
IScap(e)      .....
IS257a       .....KV.....V.VI.A...K.D.....
IS257b       .....KV.....A.VI.A...D.....
IS431         .....RV.....A.VI.A...K.D.....
ORF49         .....S.VI.D...T.....
ISRF122       .....

```

```

-----C1
IScap(i)      LIEQDHRHIKVRKTRYQSLNTAKNTLKGIECIYGLYKKNRR
IScap(e)      .....
IS257a       .....I.....A.....
IS257b       .....S.....I.....A.....
IS431         .....I.....A.....

```

```

ORF49      .....IS...I.....I.....
ISRF122    .....S..IS...I.....I.....

IScap (i)  SLQIYGFSPCNEISHMLAS
IScap (e)  .....
IS257a    .....H...I....
IS257b    .....H...I....
IS431      .....H...I....
ORF49      .....RV..I....
ISRF122    .....RV..I....

```

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la transposasa codificada por el elemento *IScap (i)*, *IScap (e)* comparada con la secuencia de la transposasa codificada por los elementos *IS257^a* (*IS257* obtenida del Genbank), *IS257^b* (obtenida de la cepa MBC212), *IS431*, *IS-RF122* y *ORF49*. Sombreados en gris se indican los dominios conservados característicos de la familia *IS6 N2*, *N3* y *C1* y en negra el motivo DDE (103).

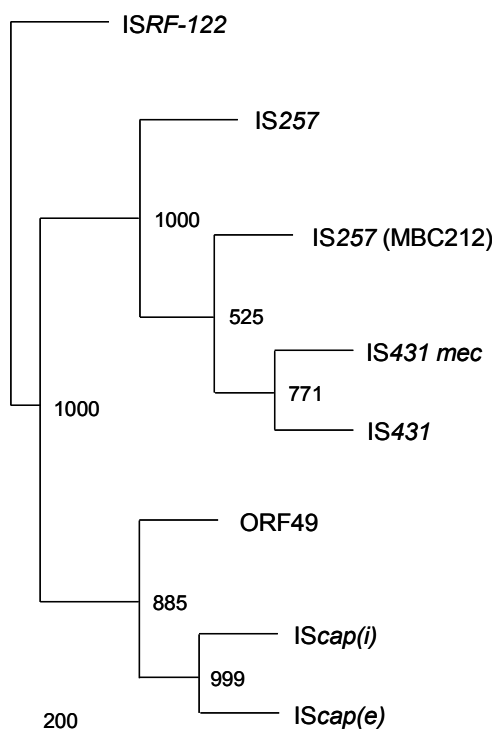
```

IScap      tggttctggttgcaaagttagaaa
IS257      ggttctggttgcaaagtt
IS431      ttctggttgcaaagt
IS431mec   cggttctggttgcaaag
ORF49      ggttctggttgcaaagtta
ISRF122    ggttctggttgcaaagtt

```

Figura 5. Comparación de las regiones repetidas invertidas. Las regiones repetitivas de *IScap (e)* e *IScap (i)* son idénticas. Similarmente, las regiones repetitivas de *IS257^a* e *IS257^b* también son idénticas entre sí. Los números de acceso del Genbank son: *IS257*: X13290; *IS431*: M18437; *IS431mec*: X53818; *ORF49*: AAC61974; *ISRF122*: YP416775.

Figura 6. Árbol “neighbor-joining” consenso basado en la secuencia aminoacídica de las transposasas de la familia *IS6* comparadas con la *IScap* (externa e interna): Este árbol fue realizado con un “bootstrap” de 1000 repeticiones y los valores obtenidos están indicados en el gráfico.



La secuencia de *IScap* de las 13 cepas de *S. aureus* NT con la delección del “cluster” *cap* (y la inserción de la *IScap* en ese mismo lugar), exhibió una identidad del

100% con las cepas prototípicas MBC204 y MBC214. Esta secuencia *IScap* fue definida como “interna” [*IScap* (i)] para diferenciarla de la denominada como *IScap* (e) (“externa” al locus *cap*), hallada en aquellas cepas con amplificación positiva para el elemento de inserción pero negativa para el fragmento de 4kb (*adhE-aldA*, con reemplazo del “cluster” *cap* por la *IScap*). La *IScap* (i) exhibió un 83-87% de identidad con las secuencias IS431 e IS257 de *S. aureus* N315 (65), un 88% con la IS-*RF122* del genoma de *S. aureus* secuenciado recientemente (50) y un 93% de identidad con la secuencia del ORF49, que es una transposasa similar a IS257 que se encuentra dentro de un plásmido que contiene la toxina EDIN-C (toxina B exfoliativa). Similarmente, la secuencia obtenida del elemento de inserción *IScap* (e) de 5 NT *cap5+* y un PC5+ *S. aureus*, exhibió un 98% de identidad con la secuencia *IScap* (i), 83-85% con IS257 e IS431 (*S. aureus* N315), un 88% con IS-*RF122* y un 93% de identidad con el ORF49. El elemento de inserción fue detectado en 9/14 aislamientos PC5+ por Southern Blot pero sólo en 1 (MBC212) de 10 aislamientos PC8+ (Test de Fisher, $p=0.0177$) (Figura 7). El amplicón obtenido para la cepa MBC212 utilizando los cebadores *IScap-f* e *IScap-r*, fue secuenciado. La secuencia aminoacídica deducida de la transposasa del elemento en *S. aureus* MBC212 exhibió una identidad del 97% con la IS257 e IS431 (N315), 91% con la IS-*RF122*, 86% con el ORF49 y un 83% de identidad con la *IScap*(i). Idénticos resultados fueron obtenidos de un estudio preliminar realizado en 3 cepas de *S. aureus* epidemiológicamente no relacionadas productoras de PC8 provenientes de Rafaela, Santa Fe, 2005 (Tabla 3). Interesantemente, los amplicones obtenidos con los cebadores *IScap-f* e *IScap-r* en las cepas PC8+ fueron diferentes en tamaño a los obtenidos para las cepas PC5+, NT *cap5+* o NT *cap5-* (793 vs 604 pb, respectivamente). En conjunto estos resultados, sugieren que el ancestro común para las cepas MBC204, MBC214 y otras halladas en nuestro país con la misma delección del “cluster” *cap* mediada por la *IScap*, era una cepa *S. aureus cap5+*.

El análisis comparativo de las secuencias correspondientes a la transposasa del elemento IS de las cepas bovinas bajo investigación demostró que *IScap(i)* (responsable

de la delección del “cluster” *cap*) difería en dos aminoácidos de *IScap(e)* hallada en cepas de *S. aureus* con el locus *cap* intacto (Figura 4). El cambio de la base C por T resultó en una sustitución conservativa de H a Y en la posición aminoacídica 74, dentro de la región N2. A pesar de que este cambio ocurre dentro de la región N2 de la tríada aminoacídica, el motivo DDE se mantuvo conservado. Al mismo tiempo, el cambio de la base A por G resultó en una sustitución no conservativa de N por D en la posición aminoacídica 86. Sin embargo, se produjo fuera de la tríada catalítica que conforma el sitio catalítico. El dominio DDE del elemento *IScap(i)* en la región N2 es idéntica al elemento ORF49, que codifica para una transposasa funcional. La secuencia aminoacídica *IScap* (e) fue idéntica en 1 cepa PC5 + (Tabla 2), 5 NT *cap5+* (Tabla 1) y en 10 cepas estafilocócicas (1 NT, *cap5+* y 9 PC5+) aisladas en el año 2005 (Tabla 3). Estos resultados indican que la *IScap* insertada en el “locus” *cap* [*IScap* (i)] ha evolucionado en un linaje cercano pero separado de la variante externa [*IScap*(e)], como también se refleja en el análisis filogenético.

El contenido de G+C de *IScap* fue del 33%, idéntico al observado en los genomas de *S. aureus* de las cepas N315, Mu50 y bastante parecido al aislamiento bovino RF-122 (32.8%) como también en IS257 (34%), IS431 (33.7%) e IS431*mec* (34.1%). Estos resultados sugieren que la *IScap*(e) ha evolucionado en un linaje cercano pero separado de *IScap*(i).

4. Conclusiones Parciales

Estos resultados sugieren que el ancestro común de las cepas MBC204 y MBC214 y muchos de otros aislamientos hallados en Argentina que contiene la misma delección mediada por la *IScap*, fueron *S. aureus cap5+*. El análisis filogenético reveló que la adquisición de las diferentes variantes de la familia IS6 podría tener relación con el tipo de huésped involucrado y la adaptación al mismo. De acuerdo a las características

observadas en la *IScap* interna y externa, podríamos sugerir que la *IScap* insertada en el locus *cap* ha evolucionado en un linaje cercano pero diferente.

4.2.1. Estudio de funcionalidad de la *IScap* (e) e *IScap*(i) en cepas NT

A fin de determinar si la transposasa codificada por la *IScap* era funcional, se realizaron ensayos de transcripción reversa y posterior amplificación por PCR. Se utilizaron dos cepas de *S. aureus*: MBC204 *cap5(8)*-*IScap*(i)+ y RA9 PC5+ *IScap* (e)+. Dado que se ha obtenido producto al amplificar el elemento de inserción utilizando como molde el ADN copia (obtenido a partir del ARN) y que no se ha obtenido producto sobre el control negativo sin ADN o sin la enzima transcriptasa reversa, podemos concluir que la transposasa de la *IScap*(i) e *IScap*(e) fueron transcriptas.

5. Conclusiones Parciales

Estos resultados sugieren que ambas transposasas se transcriben a pesar de las mutaciones halladas en el análisis de las secuencias aminoacídicas. Este hecho podría sugerir que las transposasas codificadas por los elemento *IScap*(i) e *IScap*(e) podrían ser funcionales.

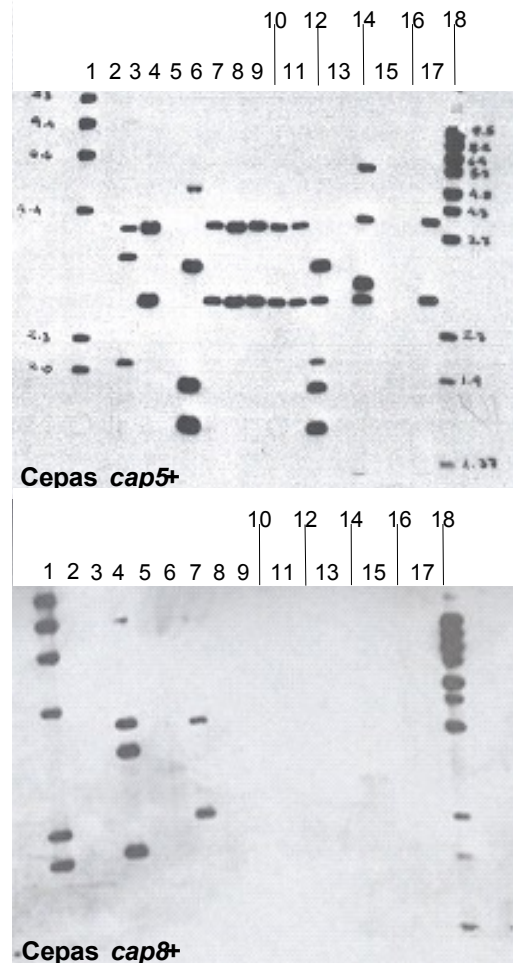
3.3. ESTUDIO DE LOS POSIBLES MECANISMOS A TRAVES DE LOS CUALES PUDO HABERSE PRODUCIDO LA PERDIDA DE LOS GENES *cap* EN LAS CEPAS DE *S. aureus* NT.

En trabajos previos, se ha sugerido que la IS257 podría mediar deleciones en plásmidos o en el cromosoma bacteriano como resultado de una recombinación homóloga (31). Esta hipótesis involucra la participación de una cepa que contenga el “cluster” *cap5(8)* y al menos dos copias de *IScap*. Con el objeto de dilucidar el mecanismo posible de pérdida de los genes *cap*, se realizó un ensayo de hibridación de

Southern Blot en 24 (14 PC5+ y 10 PC8+) aislamientos de *S. aureus cap5(8)+* para determinar el número de copias del elemento de inserción (Figura 7). Sólo 2/24 aislamientos de *S. aureus* (MB094 y MB113) contenían 2 copias del elemento IS, 8 contenían una sólo copia y 14 no mostraron hibridización positiva para este elemento (Tabla 2, Figura 7). Por lo tanto, 22 de 24 cepas no cumplían con el requisito para ser considerados precursores inmediatos de una recombinación homóloga.

Las cepas MB094 y MB113 fueron investigadas por PCR para determinar si poseían dos elementos IS internos en el “cluster” *cap* que pudiera sugerir el paso previo para que, mediante una recombinación homóloga, diera por resultado el reordenamiento genético observado en la cepa prototípica MBC204. En primer lugar, se estudió la posible presencia de una copia del elemento de inserción entre el gen *adhE* y el gen *capA* mediante una reacción de PCR utilizando los cebadores *adhE-f* y *capA-r* (ver Materiales y Métodos). Se obtuvo una amplificación positiva para el fragmento *adhE-capA*, pero el tamaño obtenido no fue diferente al obtenido para la cepa *S. aureus* Reynolds (627pb). Similarmente, el fragmento obtenido por amplificación de la región entre el extremo 3’ del gen *cap5(8)O* y la región no codificante ubicada corriente arriba del gen *aldA* (RNC) del ADN cromosomal de las cepas MB094, MB113 y Reynolds, fue idéntico (1888pb). De la misma manera, la amplificación del fragmento ente el extremo 3’ del gen *cap5(8)O* y del gen *aldA* del ADN cromosomal de las cepas MB094, MB113 y Reynolds, no mostró diferencias en el tamaño de amplicón obtenido (3939pb). Resultados similares se obtuvieron en 13 *S. aureus*, 6 NT, *cap5+* IS+ (Tabla 1) y 7 PC5+ (Tabla 2), de nuestra colección en investigación.

Figura 7. Presencia de ISs en cepas PC5 (8)+ y NT *cap5* (8)+. La membrana fue hibridizada con una sonda con un fragmento interno de la IS*cap*. La membrana superior muestra las cepas con amplificación positiva para *cap5*, mientras que el panel inferior muestra las cepas con amplificación positiva para *cap8*. Los controles negativos son *S. aureus* RN4220 (calle 2, sup. y calle 3, inferior) y el control positivo es *S. aureus* MBC204 (Calles 3, sup. y calle 4, inferior). Las bandas de las calles 4, 7, 8, 9, 10, 11 y 17 del panel superior, muestran igual patrón.



3.3.1. Conclusiones Parciales

Estos resultados sugieren que las cepas MB094, MB113 y las 13 cepas adicionales, que fueron investigadas, no poseían el elemento IS en la vecindad del “locus” *cap*. Estas cepas representan todos los aislamientos dentro de la colección de 68 cepas que poseen el “locus” *cap* y al menos una copia del elemento de inserción. Por lo tanto, no serían precursores del reordenamiento genético observado en el 55% (24/44) de las cepas NT de nuestra colección. Estos hallazgos sugieren que los eventos genéticos que llevan a la pérdida del “cluster” *cap* han ocurrido en tiempos ancestrales y todos los intermediarios, cromosómicos o plasmídicos, no han sido seleccionados y se han perdido.

3.3.2. Análisis de la secuencia obtenida por la amplificación del elemento IS en aislamientos humanos de *S. aureus*

La presencia del elemento de inserción fue investigada en 20 aislamientos humanos NT *cap5+* (11 meticilino sensibles y 9 meticilino resistentes) de 3 hospitales distintos. Todos los aislamientos mostraron una amplificación positiva para el elemento IS. El análisis de la secuencia aminoacídica reveló que la secuencia de inserción hallada tenía un 98-100% de homología con la IS257 e IS431 (N315), 91% con la ISRF-122, 86% de homología con el ORF49 y sólo un 83% de homología con la IS*cap*.

4. Conclusiones Parciales

El análisis de la secuencia obtenida de los aislamientos humanos como el estudio filogenético de la secuencia aminoacídica de los distintos elementos de inserción, sugieren que IS*cap* podría no ser relevante en aislamientos de *S. aureus* humanos y que las diferencias observadas entre la IS*cap* y las secuencias IS257 e IS431 podrían deberse a características relacionadas con la especificidad de ciertos clones *S. aureus* por distintos huéspedes (por ejemplo, humanos vs. bovinos).

3.4. ESTUDIO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA COMO POSIBLES FACTORES DE SELECCIÓN PARA LA ADQUISICION DE LA IS257/*cap*

3. Selección por factores externos: antimicrobianos y antisépticos

A fin de determinar el origen del elemento IS*cap* y dada la homología que la IS*cap* posee con respecto a la IS257, se comenzó el estudio de distintos factores de selección conocidos relacionados con éste elemento de inserción, ya que no existía en lo inmediato un factor aparente que haya seleccionado el cambio fenotípico en las cepas capsuladas

hacia un fenotipo NT con reemplazo del “cluster” *cap*. La IS257 (también conocida como IS431), ha sido hallada en distintos contextos genéticos asociada a distintos determinantes en estafilococos. Entre los determinantes más relevantes, se encuentran: 1) antisépticos y desinfectantes, casos en los que la IS257 se encuentra asociada al gen *smr* (también denominado *qacC*); 2) Antibióticos como: Tetraciclina, Bleomicina, Gentamicina, Kanamicina, Meticilina y Mupirocina, entre otros.

En base a estos datos, se estudiaron 17 cepas NT (5 *cap*⁵⁺ y 12 *cap*⁻, ver Tabla 1) y 8 cepas PC⁺ (7 PC⁵⁺ y 1PC⁸⁺, Tabla 2), en las cuales se analizó por el método de difusión la sensibilidad a oxacilina, tetraciclina, aminoglucósidos y trimetropina, como así también se determinó la presencia del gen *mecA* mediante amplificación por PCR (ver Materiales y Métodos). Todas las cepas resultaron sensibles a la oxacilina, aminoglucósidos y trimetropina. La PCR para amplificar el gen *mecA*, resultó negativa en todas las cepas analizadas. El 87% de las cepas, resultaron sensibles a tetraciclina por el método de difusión. Asimismo, el 80% resultó sensible a eritromicina, y el 93, 3% al resto de los antibióticos (Kanamicina, gentamicina, oxacilina y amikacina).

Hace ya algunos años, la industria veterinaria viene utilizando en los bovinos cubiertas de pezones (“teat-dips”) que contienen sales de amonio cuaternario como antisépticos. Dado que los genes que codifican para la resistencia a éstos se encuentran flanqueados por la IS257, se investigó la presencia de genes relacionados con amonios cuaternarios como *smr*, *qacE* y *qacA/B* en 23 cepas NT que eran positivas para la amplificación del elemento de inserción. No se obtuvo amplificación positiva para *qacE* ni para *qacA/B*. Sólo 3/23 cepas mostraron amplificación positiva para el gen *smr*, resultando estadísticamente no significativo.

4. Conclusiones Parciales

Estos resultados sugieren que la presencia del elemento *IScap* no fue seleccionada por factores como antibióticos o sales de amonio cuaternario descritos para la IS257. Por lo tanto, la presencia de éste elemento podría estar originada por otro factor de selección o ser el producto de una adquisición por transferencia horizontal que proporcione alguna característica especial al clon prevalente estafilocócico de bovinos y sea parte del proceso evolutivo del mismo. No puede descartarse en esta etapa del trabajo que el factor de selección mencionado sea un componente de la respuesta inmune del huésped dirigido contra la cápsula.

4.4. RESUMEN DE HALLAZGOS E HIPÓTESIS

- 1- Muchas cepas NT presentaron un fenotipo permanente.
- 2- No hay pérdida espontánea de los genes *cap*.
- 3- Debe haber una selección positiva por algún factor aún no descrito
- 4- Ese factor no es la resistencia a antibióticos o a sales de amonio cuaternario.
- 5- La falta de PC le proporcionaría a *S. aureus* no capsulado una ventaja selectiva sobre el capsulado para la persistencia, ya que todos los aislamientos estudiados provienen de animales infectados en forma persistente.

Por lo tanto, se puede enunciar la hipótesis que las cepas no capsuladas de *S. aureus* cumplirían un rol en la patogénesis de la mastitis bovina crónica, posibilitando la persistencia de la enfermedad.

5. PERSISTENCIA DE CEPAS NO CAPSULADAS DE *S. aureus*

4.1. Modelo murino de mastitis

La influencia de la producción de cápsula PC5 o PC8 en la persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria fue investigada mediante la inoculación de grupos de ratones en lactación por la vía intramamaria (*ima*) con cepas isogénicas de *S. aureus* que diferían en la expresión de cápsula: cepa Reynolds (PC5), cepa Reynolds (PC8) o cepa Reynolds (NT). Cada experimento fue realizado sobre grupos de ratones inoculados con 10^5 , 5×10^5 , o 10^6 UFC/glándula. Como se muestra en la Figura 8, la cantidad de UFC recuperada con las 3 cepas de las glándulas infectadas, decreció lentamente durante el curso de la infección. La tasa de depuración de cada cepa fue similar hasta el día 8; en ese punto la depuración de la cepa Reynolds (NT) disminuyó en comparación con las cepas capsuladas. El número de UFC de Reynolds (NT) por glándula fue significativamente más alta que las UFC recuperadas de las cepas PC positivas en los días 8 y 12 después de la inoculación de con 10^5 (Figura 8A). En un inóculo más alto (5×10^5 , Figura 8B) o 10^6 (Figura 8C), el número de UFC de Reynolds (NT) por glándula fue significativamente mayor que las cepas capsuladas al día 12. La infección estafilocócica siempre quedó restringida a la glándula mamaria ya que el resto de los órganos de los animales infectados no mostraron alteraciones macroscópicas y los cultivos cuantitativos de los homogenatos de riñón, bazo e hígado permanecieron negativos.

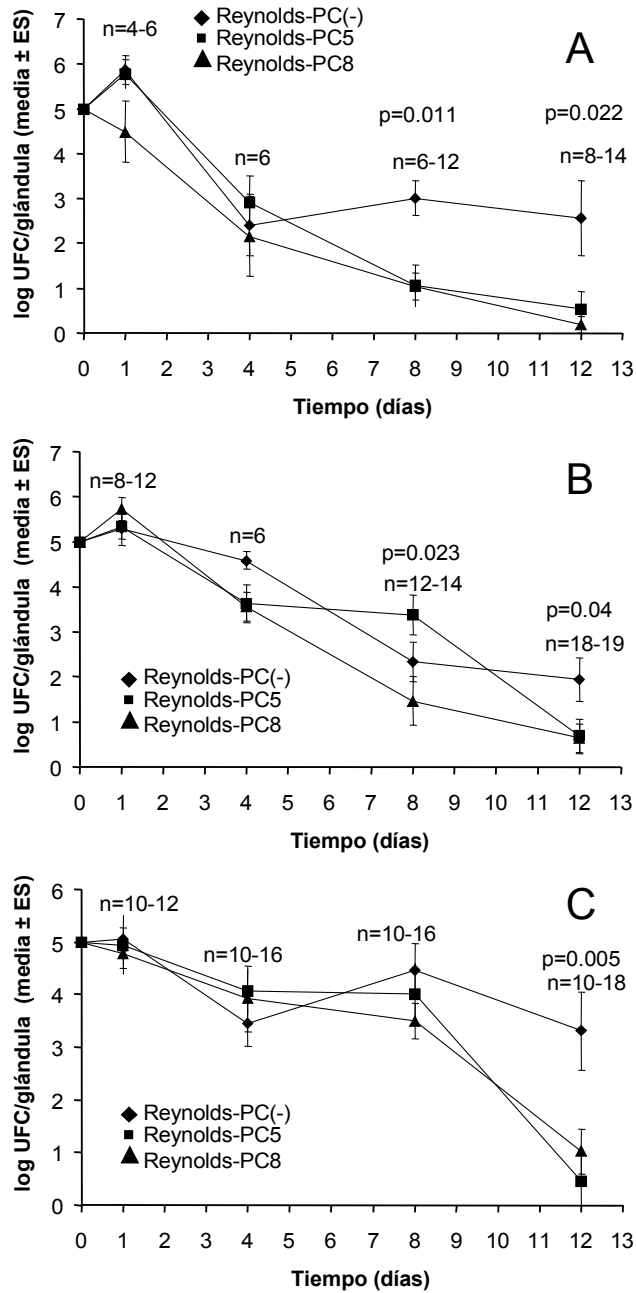


Figura 8. Efecto de la producción de cápsula sobre la virulencia de *S. aureus* en un modelo murino de mastitis. Las ordenadas representan el log de las UFC de Reynolds (NT), Reynolds (PC5) y Reynolds (PC8) recuperadas de glándulas mamarias a diferentes tiempos post inoculación con 10^5 (A), 5×10^5 (B), o 10^6 (C) UFC/glándula. El límite mínimo de detección por cultivo fue de 5 UFC/glándula

Algunos grupos de ratones fueron inoculados con una suspensión mixta de *S. aureus* que contenía Reynolds (NT) y Reynolds (PC5) o Reynolds (PC8). La relación fue 1:1 para las dos cepas, y el total del inóculo fue 10^5 ó 10^6 UFC/glándula. Las proporciones recuperadas de las dos cepas de las glándulas infectadas no tuvieron

diferencias significativas en todos los tiempos medidos con las proporciones de ambas cepas en el inóculo inicial. Por lo tanto, la curva de depuración obtenida para las mezclas bacterianas fue similar a las curvas obtenidas para las cepas capsuladas individuales (Figura 9, A y B).

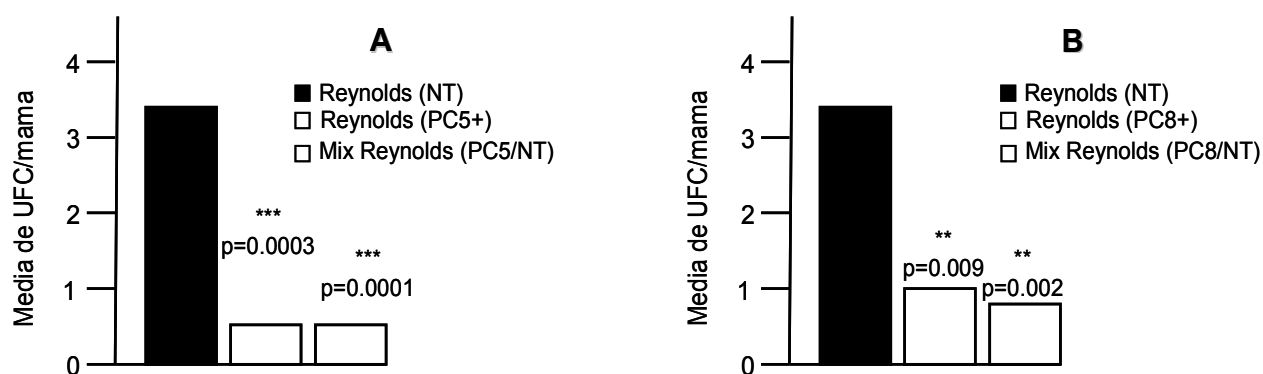


Figura 9. Experimentos de suspensiones mixtas de *S. aureus* 1:1 de Reynolds (NT) y Reynolds (PC5 o PC8) al día 12. Las UFC/mama recuperadas de las glándulas mamarias de los ratones inoculados con la mezcla son similares a las recuperadas con la cepa capsulada PC5 (A) o PC8 (B). Las diferencias entre las cepas Reynolds (PC5) o Reynolds (PC8) y la cepa Reynolds (NT) fueron significativas como así también las poblaciones mixtas con respecto a la cepa Reynolds (NT). No se observaron diferencias significativas entre las mezclas y las cepas capsuladas

5. Conclusiones Parciales

La cepa Reynolds (NT) demostró poseer una capacidad de persistir en números más altos y por más tiempo en la glándula mamaria, mientras que las cepas capsuladas Reynolds (PC5) y Reynolds (PC8) fueron eliminadas más rápidamente que la no capsulada. Por otro lado, el efecto de las mezclas entre Reynolds (PC5 u 8) y Reynolds (NT) fue similar al observado por cada cepa capsulada en forma individual. Esto significa el 50% de la población de capsulada de la mezcla es suficiente para que el sistema inmune del huésped reconozca a esta población como 100% capsulada y sea eliminada en forma similar al patrón observado para Reynolds (PC5) o Reynolds (PC8) en forma individual.

5.1. Histopatología de las glándulas infectadas

El efecto de la producción de cápsula por *S. aureus* en la infiltración de los PMN y células mononucleares en la glándula mamaria fue estudiado histológicamente. Grupos de ratones fueron inoculados con 10^5 o 10^6 UFC de *S. aureus* Reynolds (PC5), Reynolds (PC8) o Reynolds (NT) y sacrificados a los días 4, 8 o 12 días post inoculación. Las diferencias entre las 3 cepas de *S. aureus* fueron mejor observadas en el inóculo de 10^5 UFC/glándula (Figura 10). La infiltración de los PMN y las células mononucleares fue más prominente en los tejidos mamarios analizados del día 4 provenientes de ratones inoculados con Reynolds (PC5) comparados con Reynolds (PC8) o Reynolds (NT) (Figura 10). Asimismo, se observó un grado mayor de daño en el epitelio tubular y una hemorragia intersticial más severa en los tejidos mamarios de los ratones inoculados con la cepa Reynolds (PC5).

Los resultados de estas observaciones en los días 4, 8 y 12 post inoculación con 10^5 UFC de *S. aureus* fueron cuantificados con un índice de alteración tisular (ver Materiales y Métodos) y se representan en la Figura 11. Reynolds (PC5) desencadenó una inflamación severa y un daño tisular extenso en las glándulas mamarias infectadas, y su índice de alteración tisular fue significativamente más alto que el obtenido para Reynolds (NT) en los 3 tiempos analizados (Figura 11) y mayor que el obtenido para Reynolds (PC8) a los 4 y 8 días. En los tejidos mamarios infectados con la cepa no capsulada, se observó un daño tisular muy pequeño e inducción de una respuesta inflamatoria apenas moderada. La cepa Reynolds (PC8) causó un nivel intermedio de daño tisular semejante al de Reynolds (NT) en los días 4 y 8, pero más cercano al observado para Reynolds (PC5) en el día 12.

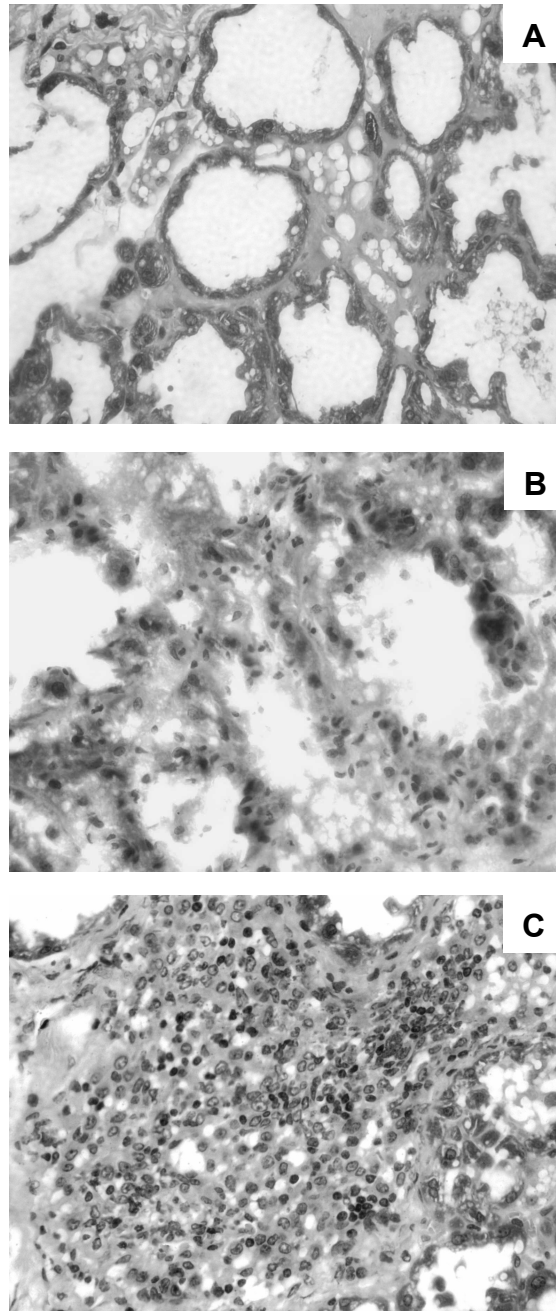


Figura 10. Secciones de glándula mamaria a los 4 días post inoculación con 10^5 UFC/glándula de *S. aureus*, teñidas con hematoxilina-eosina. No se observaron cambios o son escasos cuando la glándula fue inoculada con Reynolds (NT) (A), moderada inflamación post-inoculación de Reynolds (PC8+) (B), e inflamación severa y marcada infiltración de células PMN cuando se indujo con Reynolds (PC5+) (C).

Con la dosis de 10^6 UFC, las diferencias en las alteraciones histológicas inducidas por las tres cepas isogénicas de *S. aureus* fueron reducidas. Las tres cepas produjeron un grado de inflamación mayor y comparable (fotomicrografías no mostradas). Esta

observación no fue inesperada ya que las diferencias en la virulencia pueden ser superadas con un inoculo alto, dado que otros componentes de *S. aureus*, además de PC pueden inducir inflamación en la glándula mamaria del huésped.

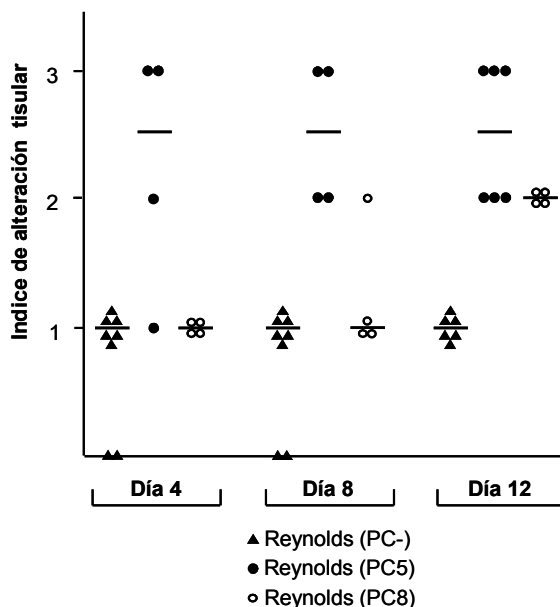


Figura 11. Índice de alteración tisular en secciones de glándula mamaria de ratones inoculados con 10^5 UFC/glándula de *S. aureus* Reynolds (NT) (triángulos), Reynolds (PC5) (círculos rellenos), o Reynolds (PC8) (círculos vacíos). Cada barra representa la mediana de 4-8 glándulas mamarias. Se observa una diferencia significativa entre los 3 grupos ($P < 0.0001$, ANOVA no paramétrico). Los niveles de significación de las comparaciones individuales fueron: Reynolds (NT) vs. Reynolds (PC5) en el día 4, $p = 0.033$; Reynolds (NT) vs. Reynolds (PC5) en el día 8 $p = 0.004$; Reynolds (NT) vs. Reynolds (PC5) en el día 12, $p = 0.002$; Reynolds (NT) vs. Reynolds (PC8) en el día 12, $p = 0.0010$.

4. Conclusiones Parciales

Nuestro análisis histológico reveló que las células PMN fueron reclutadas a la glándula mamaria en alta cantidad en respuesta a la infección por *S. aureus* PC5+ o PC8+, y éste influjo de PMN se correlacionó con la mayor depuración de éstas cepas, aunque con mayores alteraciones histopatológicas.

4.2. Internalización de *S. aureus* en células MAC-T.

Hensen y colaboradores reportaron que en los estadios tempranos y crónicos de la infección mamaria, *S. aureus* Newbound 305 (serotipo 5) fue localizado dentro del lumen del alveolo o conducto lactífero en asociación con el epitelio y dentro de células fagocíticas (49). Nosotros consideramos que Reynolds (NT) podría persistir por mayor tiempo en la glándula infectada del ratón por invasión del tejido intersticial. Por lo tanto, se investigó el efecto de PC5 y PC8 sobre la internalización de *S. aureus* en células epiteliales bovinas in vitro. Las células MAC-T fueron incubadas con *S. aureus* en una multiplicidad de infección de 15 a 20 por una hora a 37°C, en ese punto, las células fueron lavadas y se agregó el medio con antibiótico para eliminar el estafilococo extracelular. Como se muestra en la Figura 12, Reynolds (NT) y la cepa NT no relacionada RN6390 de *S. aureus*, fueron internalizadas en mayor media que las cepas capsuladas Reynolds (PC5) o Reynolds (PC8). El número total de bacterias viables dentro de las células epiteliales disminuyó más de 10 veces entre las 2h (Figura 12A) y 24h (Figura 12B). La supervivencia de *S. aureus* dentro de las células MAC-T no fue afectada por la producción de PC5 o PC8 y la viabilidad celular epitelial permaneció alta (>95%) 24hs después del tratamiento con antibiótico. Asimismo, los niveles de apoptosis de las células MAC-T después de 24h post inoculación de la bacteria fueron muy bajos y no se observaron diferencias significativas entre las diferentes cepas bacterianas utilizadas. Experimentos preliminares en nuestro laboratorio con aislamientos de *S. aureus* (n=8) obtenidos de vacas con mastitis, revelaron niveles similares de supervivencia de las células MAC-T (>95%) y números comparables de estafilococo intracelular 24hs post inoculación de la bacteria.

5. Conclusiones Parciales

Los resultados in vitro sugieren que *S. aureus* no capsulado es internalizado más eficientemente que las cepas capsuladas. Se especula que así *S. aureus* podría evitar la depuración mediada por una respuesta inmune adaptativa mediante la internalización dentro de las células epiteliales mamarias bovinas.

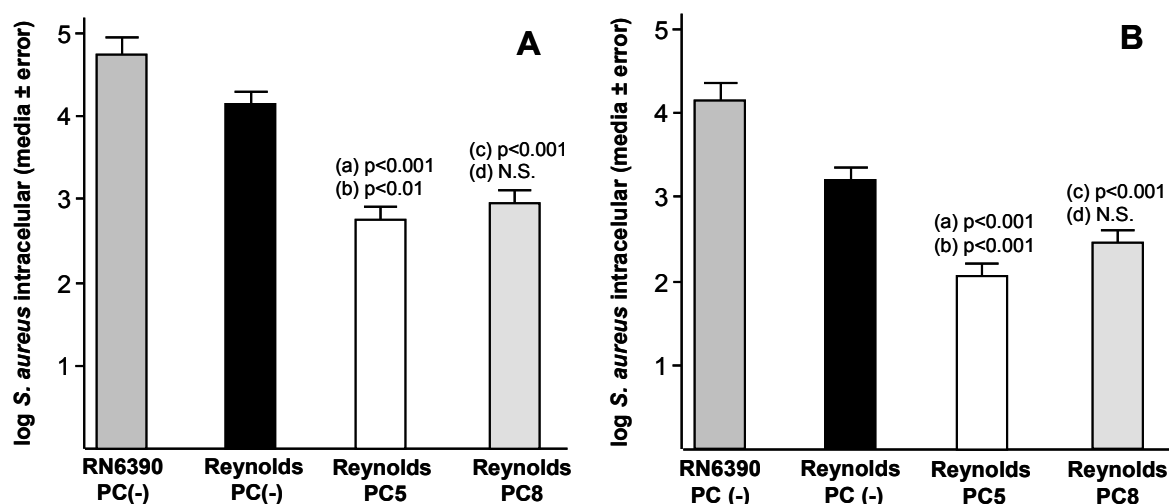


Figura 12. Internalización de *S. aureus* en células MAC-T medida como las UFC remanentes después de 2hs (A) o 24hs (B) de incubación post-eliminación de las bacterias extracelulares. Cada barra representa el número de UFC/ml intracelulares de 11 a 24 pocillos (A) o de 17 a 24 pocillos (B) pertenecientes a diferentes experimentos. Los valores a y c representan los valores de *P* que surgen de la comparación con RN6390, mientras que los valores b y d, surgen de la comparación con la cepa Reynolds (NT).

6. SELECCIÓN DE CEPAS NO CAPSULADAS DE *S. aureus*

5. Selección de cepas NT por factores relacionados con la respuesta del huésped.

De acuerdo a los resultados anteriores, las cepas NT tendrían una ventaja adaptativa para poder permanecer en el huésped, por lo tanto deberían de seleccionarse in vivo durante el transcurso de la infección, ya que se estableció que esa selección no se puede atribuir a antibióticos o sales de amonio cuaternario. Se sospecha que el factor de

presión selectiva podría ser un componente de la respuesta inmune. A fin de determinar cuál es el factor que podría seleccionar las cepas con fenotipo NT y evaluar la hipótesis que la delección del “cluster” *cap* pueda ocurrir espontáneamente en presencia del elemento de inserción *IScap*, se diseñaron experimentos *in vitro* e *in vivo* para enriquecer cultivos e inóculos de *S. aureus*, respectivamente, en derivados (D) NT, como se describe en Materiales y Métodos. En estos experimentos se utilizaron las cepas RA9 (PC5+, *IScap* (e)), RA18 (PC5+, *IS257/IScap* -) y MBC212 (PC8+, *IS257*+). Las características de los derivados NT obtenidos en estos experimentos se describen en la Tabla 6. Después de 9-10 o 4-6 ciclos de enriquecimiento *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, se obtuvieron diferentes colonias con fenotipo NT determinados por “colony immunoblot”. Estos NT presentaban distintas delecciones genéticas determinadas por PCR al amplificar el “cluster” *cap*. La cepa parental RA9 contenía el elemento *IScap* (e), mientras que la cepa RA18 carecía del elemento de inserción.

Se estudiaron 20 derivados NT por experimento y se detectaron 11 tipos diferentes de NT, resumidos en la Tabla 6. Ninguno de los derivados NT obtenidos mostraron amplificación positiva del fragmento de 4kb (correspondiente a la región delimitada por los genes “housekeeping”, con la inserción de *IScap* y delección del “cluster” *cap*), como se observó en las cepas prototípicas MBC204 y MBC214 u otros aislamientos bovinos analizados de nuestro país (Tabla 6).

En la mayoría de los casos, se halló más de una lesión genética responsable del fenotipo NT. Uno de los derivados NT (RA18D13), fue obtenido por enriquecimiento de la cepa RA18 que no contiene la *IScap* ni la *IS257*, indicando que la presencia de estos elementos de inserción no sería requerida para que la delección ocurra. El fenotipo NT de éstos derivado es estable, puesto que se mantuvo después de 10 subcultivos *in vitro* en CSA (Tabla 6).

Tabla 6. Descripción de distintas variantes NT obtenidas a partir de cepas capsuladas CP5+ que portaban la IScap (e) (RA) o que no la portaban (RA18).

Experimento	Cepa	Amplificación del “cluster” cap
In vitro	RA9-D1	Conservado (*)
	RA9-D2	Sin amplificación de <i>capA-E</i> (**)
	RA9-D3	Sin amplificación de <i>capH-K</i> (**)
In vivo A	RA9-D4	Conservado (*)
	RA9-D5	Sin amplificación de <i>capP-aldA</i> (**)
In vivo B	RA9-D6	Conservado (*)
	RA9-D7	Sin amplificación de <i>capH-capK</i> (**)
In vitro	RA18-D1	Conservado
In vivo	RA18-D2	Conservado (*)
	RA18-D3	Sin amplificación de <i>capH-capK</i> . (**)
In vivo	MBC212	Conservado (*)

(*) *Conservado* significa que los amplicones obtenidos presentaban el mismo tamaño que el obtenido para las cepas controles de *S. aureus* Reynolds (PC5) o Becker (PC8)

(**) Amplicones con tamaño idéntico a las cepas de *S. aureus* Reynolds (PC5) o Becker (PC8) fueron obtenidos para cada fragmento mientras que no se obtuvo amplicón para la región del “cluster” *cap* indicada en la tabla.

6. Conclusiones Parciales

El tratamiento de una cepa productora de PC5 con anticuerpos anti-PC5 produce la selección de variantes NT con un cambio genético permanente, el cual puede producirse sin la presencia de éste elemento de inserción. La presencia de la IScap (e) no se asoció a la generación de una deleción total del “cluster” *cap* como la descrita en la cepa prototípica bovina MBC204.

6.1. Efecto del suero anti-PC5 sobre *S. aureus* en la glándula mamaria

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos in vitro, pudo observarse que mediante anticuerpos anti-PC5 era factible la obtención de cepas NT. Por lo tanto, en una segunda instancia se estudió la posibilidad de que estos variantes NT puedan ser obtenidos in vivo mediante una modificación del modelo murino de mastitis bovina. El modelo murino de infección aguda de la glándula mamaria fue utilizado previamente para el estudio de los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de las infecciones intramamarias (22). Se inmunizaron pasivamente grupos de ratones por la ruta intraperitoneal (*ip*) con anticuerpo anti-PC5 o anti-PC8 o suero no inmune (control). A las 24hs post inmunización, los ratones fueron inoculados con una dosis de 1×10^6 UFC/mama por la ruta intramamaria (*ima*) con la cepa RA9 (PC5) o MBC212 (PC8). A las 96hs, los ratones fueron sacrificados, se removieron quirúrgicamente las mamas L4 y R4, se homogenizaron y se realizaron recuentos bacteriológicos en TSA. Los cultivos cuantitativos de las glándulas mamarias revelaron que el tratamiento específico con el anticuerpo anti-PC5 disminuyó en cuatro ordenes de 10 el recuento de UFC de *S. aureus* recuperadas con respecto a los controles no tratados, resultando estadísticamente significativo ($P > 0.01$, Test de Mann-Whitney, no paramétrico) (Figura 13). Resultados similares fueron obtenidos con el tratamiento con el anticuerpo anti-PC8 e inoculación con la cepa MBC212 (PC8). (Figura 13).

7. Conclusiones Parciales

Los resultados demuestran que la presencia de anticuerpos específicos anticápsula de *S. aureus*, son eficientes para la eliminación de un gran porcentaje de la población bacteriana de un inóculo intramamario.

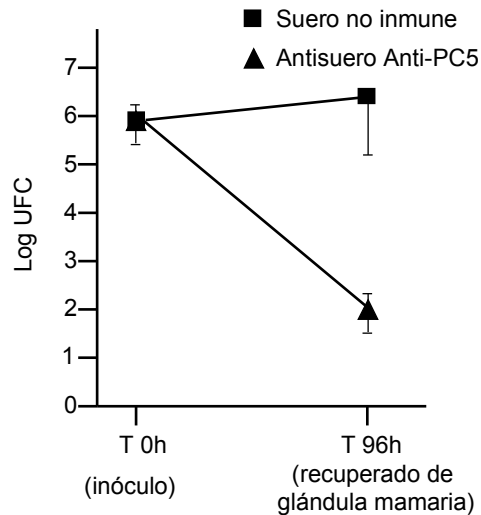


Figura 13. Efecto de la administración del suero anti-PC5 sobre el número de UFC intramamarias de *S. aureus*. Se observó una disminución en 4 órdenes de 10 con respecto al control inoculado con suero de conejo no inmune a las 96hs ($p > 0.01$).

7.1. Selección de cepas NT de *S. aureus* en la glándula mamaria por suero anti-PC5

Las colonias recuperadas de las glándulas mamarias a las 96hs post inoculación, fueron reinyectadas en un nuevo grupo de ratones preinmunizados pasivamente de acuerdo a la descripción anterior, con anticuerpo anti-PC5 o anti-PC8 o suero no inmune ($n=6-8$). Los ciclos fueron repetidos hasta 10 veces. Los cultivos cuantitativos obtenidos de cada homogenato de la glándula mamaria fueron analizados para evaluar la expresión de cápsula por el método de “colony immunoblot” (Figura 14).

Los resultados de los derivados NT de *S. aureus* obtenidos post selección con el anticuerpo específico anti-cápsula, se muestran en la Figura 15. La presión selectiva con anticuerpo anti-PC indujo la aparición del 11% de colonias NT después del cuarto ciclo y 50% en el quinto ciclo, todos derivados de la cepa parental PC5+ RA9. Resultados similares se obtuvieron con una cepa PC8+, MBC212, en éste caso se obtuvo 40% al ciclo 6 y el 95% en el ciclo siete. No se obtuvieron cepas NT *S. aureus* en los ratones

controles de cada cepa tratados con suero no inmune, hasta el ciclo 10, en el que se dio por concluido el experimento (Figura 15).

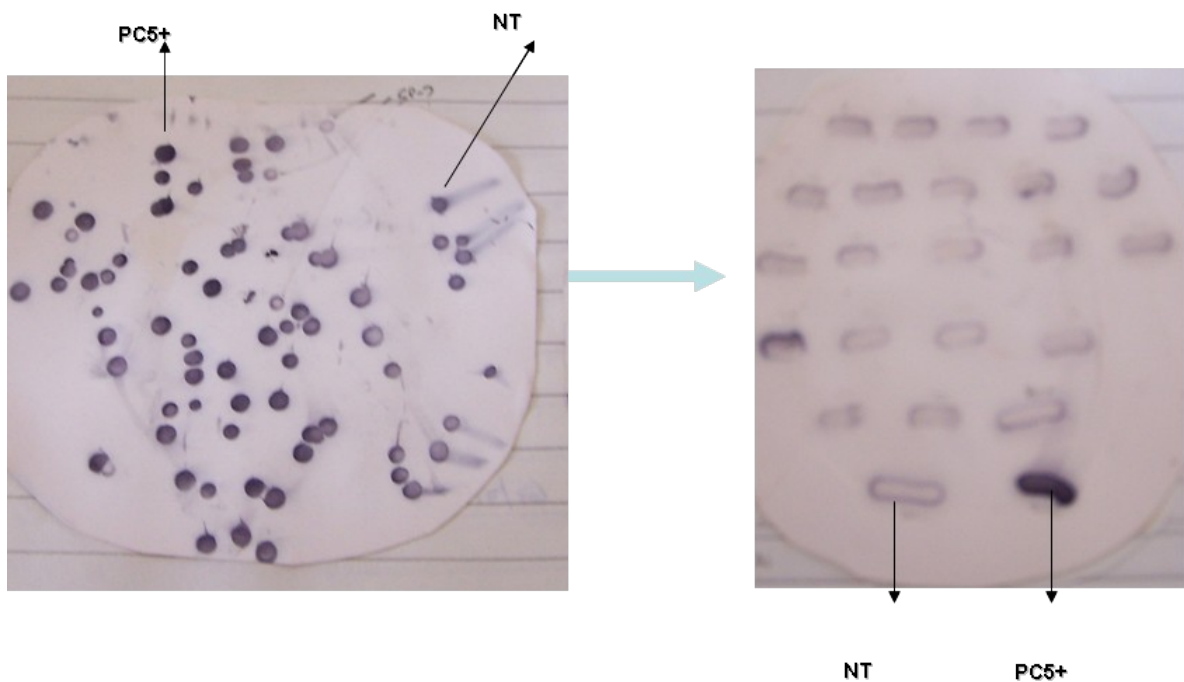


Figura 14. “Colony immunoblot” de las colonias obtenidas del homogenato de la glándula mamaria y su posterior confirmación. Puede observarse que éste método es muy efectivo en la confirmación de cepas NT

A fin de determinar si los derivados NT obtenidos presentaban alguna alteración fenotípica, se analizó la expresión de α/β hemólisis y producción de biofilm como se describió en materiales y métodos (Figuras 16 A y B, y Figura 17). Los halos obtenidos de producción de hemólisis de las cepas NT obtenidas, fueron similares a la cepa parental, al igual que la producción de biopelícula (“biofilm”). La ausencia de cambios fenotípicos en el análisis in vitro de éstas características, podría sugerir que las variantes NT obtenidos no tendrían mutaciones en genes reguladores como los genes del sistema *agr* que regula la producción de varios factores de virulencia, incluyendo la producción de cápsula.

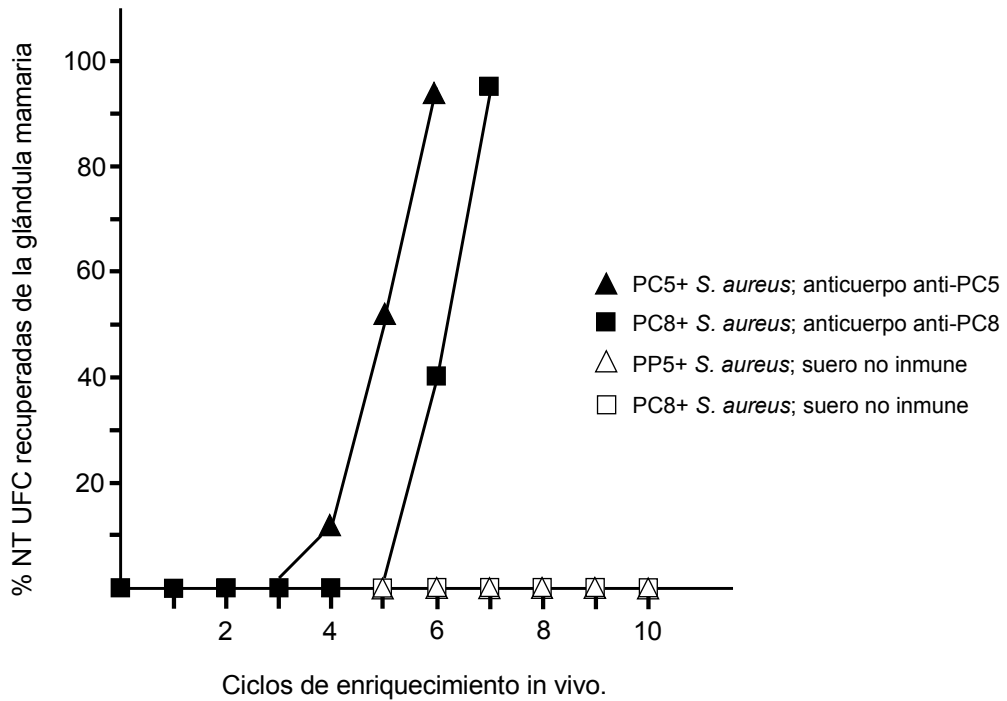


Figura 15. Cepas NT derivadas del tratamiento con anticuerpo anti-PC5, anti-PC8 o suero no inmune. Se observa que las cepas NT sólo aparecen en el tratamiento con los anticuerpos correspondientes y no en los ratones tratados con el suero no inmune. Se muestran dos ciclos continuos de recuperación de NT, la tendencia continúa hasta los 10 ciclos de tratamiento.

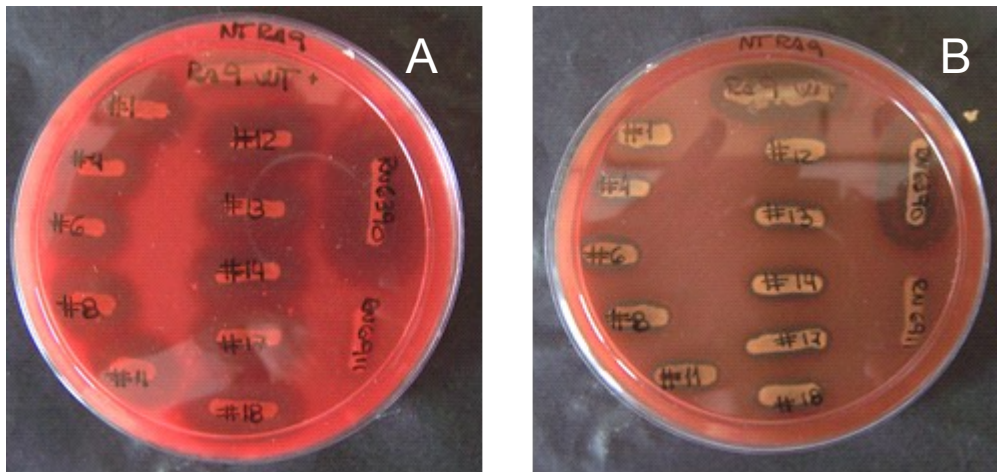


Figura 16. Análisis de producción de α hemólisis (A) y β hemólisis (B) de las cepas NT obtenidas con respecto a la cepa parental RA9 (PC5). Resultados similares se obtuvieron con la cepa MBC 212 (PC8).

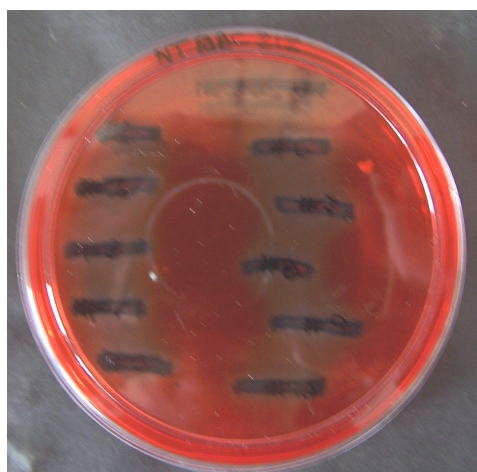


Figura 17. Análisis de producción de biofilm. Se muestra los derivados NT de la cepa MBC212 y la cepa parental. No se observaron diferencias. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para la cepa RA9.

8. Conclusiones Parciales

Los resultados sugieren que la presencia de anticuerpo circulante anticápsula, puede seleccionar positivamente cepas NT de *S. aureus* en la glándula mamaria. Asimismo, las cepas NT obtenidas no cuentan con otros cambios fenotípicos como la producción de hemólisis y producción de biopelícula. Por lo tanto, estas cepas no portarían mutaciones a nivel regulatorio de la expresión de factores de virulencia.

8.1. Selección de variantes puntiformes de *S. aureus* en la glándula mamaria por suero anti-PC5

En los mismos experimentos descritos en 5.3., a partir del ciclo 8 de enriquecimiento se observó la aparición de colonias puntiformes (denominadas “SCV like”, del inglés “small colony variants”) a las 48hs de incubación a 37°C de las placas obtenidas de los cultivos primarios de las glándulas mamarias (Figura 18). La aparición de colonias “SCV like” no fue observada en las placas obtenidas de glándulas mamarias de ratones tratados con suero no inmune. Estas colonias no presentaron hemólisis en la

placa original, sin embargo, al ser subcultivadas en agar sangre y agar TSA, el crecimiento fue normal y produjeron hemólisis. La cantidad de puntiformes fue en aumento proporcional al número de ciclos (22% en el ciclo 6, 44% en el ciclo 8, 65-70% en los ciclos 9 y 10). Esta variante SCV estaba en igual proporción que las colonias del fenotipo normal a partir del ciclo 9. En el aislamiento de una de las colonias puntiformes del ciclo 9, se observó un fenotipo más estable que no revirtió al ser subcultivada en agar sangre y TSA durante dos pasajes. Para determinar si esta colonia presentaba las características descritas para las SCV, se realizaron diferentes pruebas bioquímicas. La reacción de coagulasa resultó positiva a las 18hs, la producción de catalasa resultó débil respecto a la cepa de crecimiento normal, no fermentó ni creció en el manitol y mostró expresión de cápsula en el ensayo de “colony immunoblot”. La confirmación de estas características permitió afirmar que la variante puntiforme era una “SCV”. Sin embargo, a partir del tercer pasaje esta cepa revirtió al fenotipo normal. Este efecto ha sido descrito en otros trabajos donde el fenotipo puntiforme no pudo mantenerse por más de dos subcultivos.

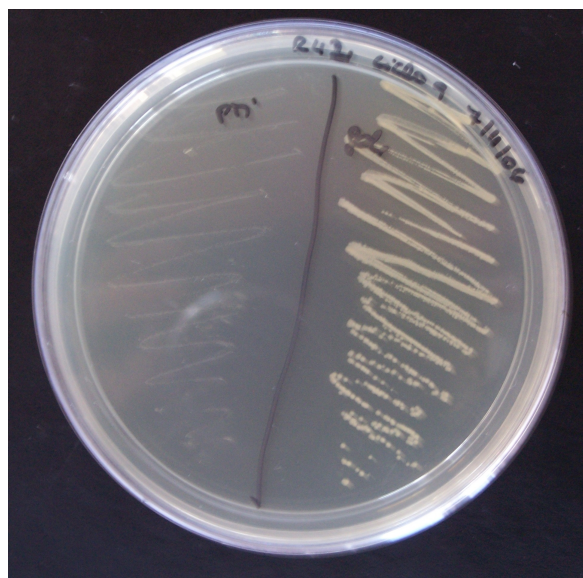


Figura 18. Comparación entre fenotipo puntiforme (crecimiento a las 48hs) y fenotipo normal. Ambas colonias fueron recuperadas de la glándula mamaria de ratones pre tratados con anticuerpos anti-PC5 en el ciclo 9 de enriquecimiento

9. Conclusiones Parciales

La aparición de variantes puntiformes en las placas obtenidas de glándulas mamarias de ratones tratados con anticuerpo específico anti-PC, podría ser resultado de mutaciones regulatorias a otro nivel del observado en los derivados NT. Estas variantes puntiformes son producto del tratamiento con anticuerpo, por lo tanto, la presencia de anticuerpo circulante anticápsula estaría seleccionando no sólo cepas no capsuladas, sino también subpoblaciones con otras características fenotípicas con mayores ventajas para la permanencia de la bacteria. Estos resultados podrían ser una explicación para la persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria.

9.1. Patogénesis de *S. aureus* PC+ y NT

Para comprender mejor el proceso de infección producido por *S. aureus*, se realizó un estudio histopatológico de las glándulas mamarias obtenidas 96 hs después del desafío intramamario con *S. aureus* cepa RA9, al cabo de cada uno de los distintos ciclos de enriquecimiento in vivo. Los ratones fueron pretratados como se indicó en Materiales y Métodos con antisuero anti-PC5 o con suero no inmune de conejo (control). Posteriormente a las 96 hs iniciales, correspondientes al primer ciclo de selección in vivo, no se observaron diferencias histológicas significativas entre las glándulas mamarias obtenidas de los ratones que había sido tratados con anticuerpo anticápsula o con el suero no inmune ($p=0.32$). Entre los ciclos 5-7, la densidad celular de PMN en el tejido mamario obtenido de ratones pretratados con anti-PC fue significativamente mayor que en los ratones no tratados ($p=0.025$, Mann-Whitney). Interesantemente, entre los ciclos 8-10, el número de PMN volvió a presentar valores similares a los primeros ciclos en los cortes histológicos provenientes de ratones tratados con el anticuerpo específico; en

tanto siguieron en aumento en la serie de ratones tratados con suero no inmune ($p=0.0017$) (Figura 19, Tabla 7).

Las variaciones de la densidad de PMN en la glándula mamaria se acompañaron de otros cambios histológicos coincidentes con el desarrollo de un proceso inflamatorio-infeccioso que es resuelto y en las que la glándula mamaria mostró signos de funcionalidad normal, después del ciclo 9, en los ratones pretratados con el antisuero anti-PC5. Al mismo tiempo, en las imágenes de los ciclos 8-9, se observó la recuperación de la citoarquitectura de la glándula, como indicando la resolución del proceso infeccioso. Sin embargo, en las preparaciones obtenidas de ratones tratados con suero no inmune, se evidenció un aumento progresivo de la densidad de PMN seguido de alteraciones histoestructurales que indican deterioro funcional paulatino de la glándula con pérdida casi total de las características del tejido mamario (Figura 20).

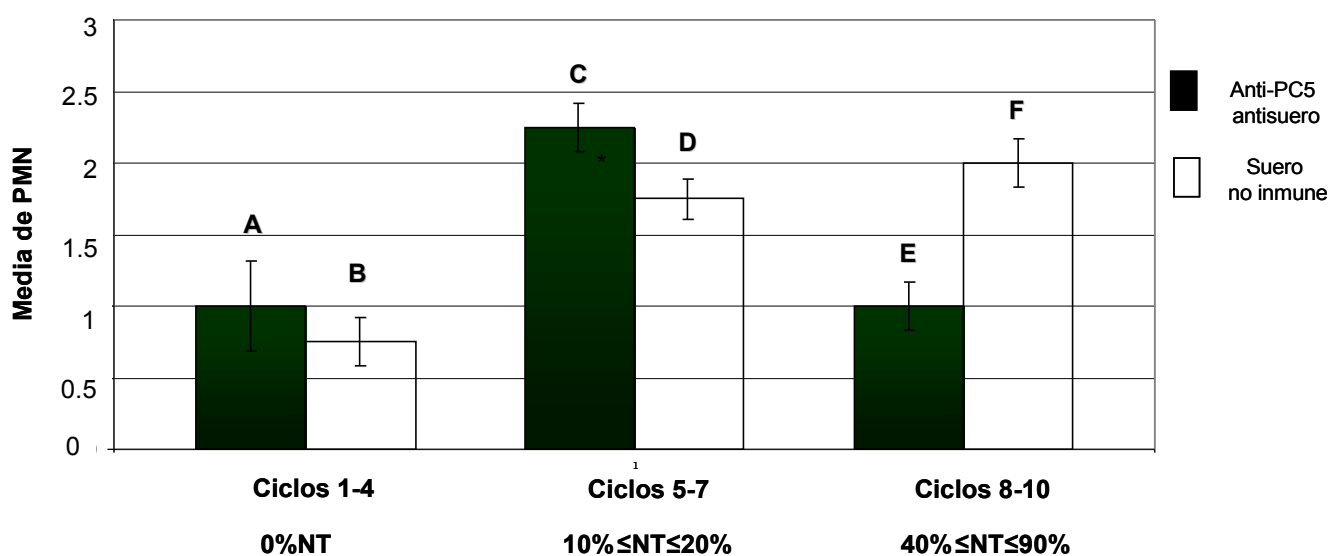


Figura 19. Migración de PMN en ratones inoculados con *S. aureus* RA9 (PC5) y tratados con suero específico anti-PC5 o suero no inmune ($n= 5-7$).

Sin embargo, en las preparaciones obtenidas de ratones tratados con suero no inmune, se evidenció un aumento progresivo de la densidad de PMN seguido de alteraciones histoestructurales que indican deterioro funcional paulatino de la glándula con pérdida casi total de las características del tejido mamario (Figura 20).

Tabla 7. Comparación estadística entre las columnas de la Figura 19 con el test Mann-Whitney. **S:** significativo, **NS:** no significativo.

Comparación	Resultado	significancia
<i>Entre tratados con anti-PC5 y con suero no inmune</i>		
A vs B	p= 0.32	NS
C vs D	p= 0.025	S
E vs F	p= 0.0017	S
<i>Entre tratados con anti-PC5</i>		
A vs C	p=0.0083	S
A vs E	p=0.9	NS
C vs E	p=0.0015	S
<i>Entre tratados con suero no inmune</i>		
B vs D	p=0.0048	S
B vs F	p=0.0003	S
D vs F	p=0.06	NS

En estos experimentos, los derivados NT de *S. aureus* RA9 fueron evidentes en el período entre los ciclos 5-7, con un 31%, aumentando hasta un 83% entre los ciclos 8-10. Se observó que el mayor porcentaje de derivados NT coincidía con la resolución de la infección, el regeneramiento de la citoarquitectura de la glándula mamaria y con la recuperación de las cantidades iniciales de PMN en el tejido (Figuras 15, 19 y 20).

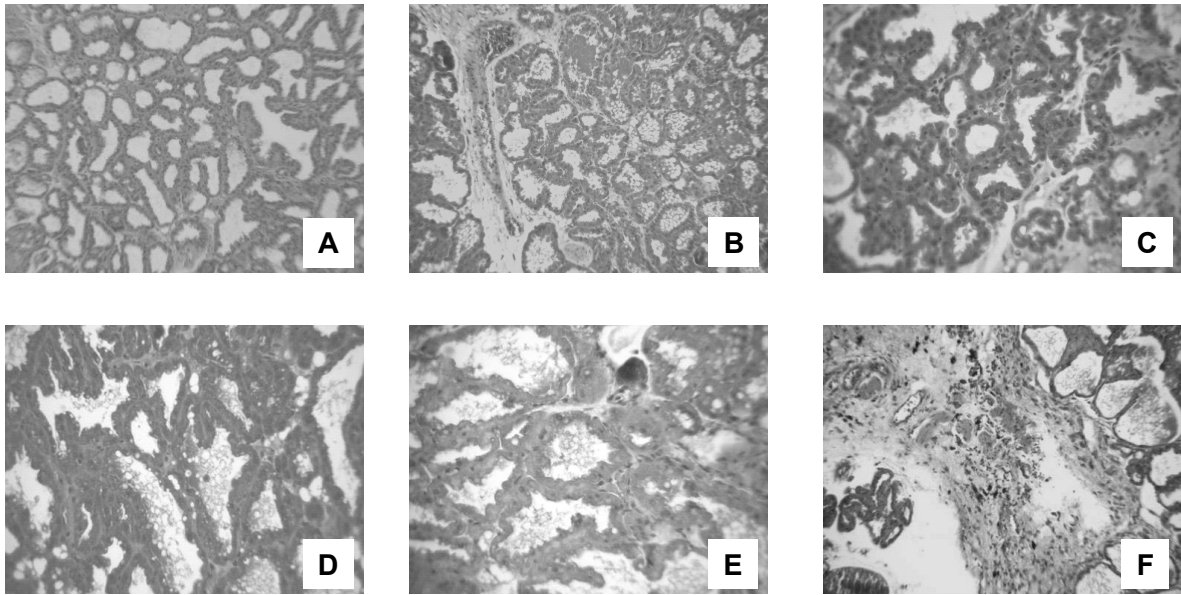


Figura 20. Preparados obtenidos de ratones tratados con anticuerpo anti-PC5 (B y E) y de ratones tratados con suero no inmune (C y F), con respecto a los controles no inoculados (A y D). En la figura, A, B y C representan la histopatología de las glándulas mamarias al inicio del experimento (ciclos 1-4), D, E y F representan la histopatología de las glándulas mamarias en el final del experimento (ciclos 8-10). Es evidente la pérdida de estructura en los preparados obtenidos de ratones no inmunizados al final del experimento, mientras la citoarquitectura es recuperada en las glándulas de los ratones tratados con anticuerpo anti-PC5.

10. Conclusiones Parciales

Los resultados indican que el tratamiento con suero hiperinmune anti-cápsula disminuye el número de bacterias, como fue determinado anteriormente, pero que también selecciona variantes NT. Estas producen menor daño del tejido y son más eficaces en la evasión del sistema inmune. Asimismo, la disminución de UFC que produce la presencia de anticuerpo anti-PC5 no es la causa de un menor daño en la glándula mamaria ya que los valores iniciales en presencia y ausencia del anti-PC5 son similares. Por el contrario, éstos son producidos por el fenotipo bacteriano que es seleccionado por este factor. A pesar que la estructura de la glándula mamaria es regenerada, se siguen aislando *S. aureus* pero son NT. Por lo tanto, la presencia de anticuerpo específico anti-PC circulante podría ser un requerimiento para que una infección aguda intramamaria derive en una patología persistente.

10.1. Estudio de cepas NT de *S. aureus* en un modelo de bacteremia

De acuerdo a la bibliografía, el rol de la cápsula de *S. aureus* en la patogénesis de las infecciones es controvertido. Algunos autores sostienen que es importante para la virulencia y otros que no. De acuerdo a los resultados expuestos, el rol de la cápsula de *S. aureus* depende de la patología que se trate, es decir, del microambiente en donde se encuentra la bacteria. En este sentido, se planteó la hipótesis que si de una cepa capsulada, después de varios ciclos, se selecciona una cepa NT que resulta más eficiente en ese microambiente de la glándula mamaria, una cepa NT en la sangre debería depurarse o revertir al fenotipo capsulado.

A fin de probar dicha hipótesis, se realizó un experimento de bacteremia para lo cual se inoculó un grupo de ratones por la ruta intraperitoneal (*ip*) ($n=4-6$) con un inóculo de 1×10^8 UFC de una cepa NT obtenida de los experimentos de enriquecimiento in vivo realizados con la cepa parental RA9 (PC5). La dosis fue determinada por una curva de muerte realizada previamente con esta cepa bacteriana en ratones CF-1. De acuerdo a la hipótesis planteada, la dosis seleccionada debía ser tal que permitiera una buena recuperación de bacterias del fluido sanguíneo sin que provoque la muerte del animal en 24 hs. La cepa NT utilizada fue analizada por PCR a fin de determinar que no contuviera lesiones genéticas relevantes en los genes *cap* para posibilitar, en caso que existiera, la reversión de fenotipo. A las 24 hs los ratones fueron sacrificados, se extrajo la sangre por punción intracardíaca y se cultivó cuantitativamente en TSA. De las placas obtenidas, se analizó la expresión de cápsula por el método de "colony immunoblot", el resto de las placas fueron utilizadas para realizar un nuevo inóculo para inyectar a un nuevo grupo de ratones. Este ciclo fue repetido 10 veces.

A medida que se realizaron los distintos ciclos, se observó una disminución en la cantidad de UFC recuperadas de la cepa NT. Sin embargo, a partir del ciclo 3,

comenzaron a observarse colonias que revirtieron su fenotipo (aproximadamente el 11% de la población) y que comenzaron a expresar cápsula. A partir del cuarto ciclo, la cantidad de revertantes fue entre 20-25%, valor que se mantuvo constante hasta el ciclo 10.

11. Conclusiones Parciales

Los resultados demuestran que el PC de *S. aureus* es necesario como factor de virulencia de acuerdo al microambiente en que se encuentre la bacteria. Por lo tanto, las cepas no capsuladas de *S. aureus* siguen constituyendo durante el transcurso de la infección un riesgo epidemiológico ya que pueden evadir al sistema inmune y permanecer en la glándula mamaria o pasar a circulación y revertir a una cepa capsulada, derivando en una infección aguda o una diseminación hacia focos distantes.

Discusión

Staphylococcus aureus es el patógeno más frecuentemente aislado de la glándula mamaria de bovinos con mastitis. Las infecciones intramamarias (*Ima*) constituyen la patología infecciosa más prevalente de los bovinos destinados a la lechería (62, 82; 116, 134). A nivel mundial esta enfermedad causa pérdidas anuales de alrededor de 35 mil millones de dólares (37) y en nuestro país, que posee una industria lechera de significativa magnitud, las pérdidas para este sector, son por demás cuantiosas (91).

A pesar de los numerosos estudios destinados al diseño de estrategias inmunoproliféricas para la prevención de la mastitis, no se cuenta hasta el presente con una vacuna efectiva de uso práctico que permita prevenir las infecciones *Ima* por *S. aureus* (39, 115). El diseño racional de una vacuna a componente único requiere un conocimiento cabal del factor de virulencia crucial para la patogenia. Distintos intentos de inmunización activa se han realizado para la prevención de la mastitis bovina causada por *S. aureus* (20, 21, 33; 37; 62, 86, 131,134). Asimismo, dada la importancia atribuida al polisacárido capsular (PC) en la patogénesis de la mastitis estafilocócica de los bovinos, distintos investigadores diseñaron vacunas incluyendo extractos de distintos PC8 o PC5 purificado (37, 70, 86, 131, 120). Sin embargo, aún no se ha podido comprobar su efectividad en bovinos y su utilización en ellos está en discusión (71, 117). En estos trabajos, se puso gran énfasis en aumentar mediante la vacunación los niveles de anticuerpos en plasma, sin considerar la necesidad de contar con efectores de la respuesta inmune adaptativa local que pudieran actuar rápidamente luego del ingreso de la bacteria a la glándula, como por ejemplo IgA secretoria específica para neutralizar toxinas o para impedir la adherencia y la colonización. Más aún, a pesar de las evidencias que indican que la susceptibilidad para las infecciones *Ima* se correlaciona con funciones celulares disminuidas en la glándula mamaria y que *S. aureus* es capaz de sobrevivir en forma intracelular, nunca se consideró la necesidad de inducir inmunidad adaptativa mediada por células Th1 para prevenir las infecciones por *S. aureus* (4), excepto en estudios de nuestro laboratorio (19, 39).

La hipótesis alternativa de nuestro laboratorio, a los efectos experimentales es que, dado que las patologías producidas por *S. aureus* no se deben a un único factor de patogenicidad sino a la acción coordinada de varios factores (116), la prevención de las infecciones por este microorganismo podría lograrse mediante vacunación con mutantes atenuados inoculados por la ruta apropiada. En este sentido, se ha demostrado que la inmunización *Ima* con una cepa de *S. aureus* atenuada por termosensibilidad inducía protección en la glándula mamaria frente al desafío experimental con la cepa virulenta parental (35, 38; 39). Recientemente en nuestro laboratorio, se ha demostrado que una mutante auxotrófica en los genes *aro*, es eficiente en inducir inmunidad protectora en un modelo murino de mastitis (19). Independientemente del método de atenuación a utilizar, el uso de una bacteria completa como vacuna plantea el interrogante acerca de cuáles son las características que debe poseer la cepa a elegir para la construcción de una vacuna atenuada.

La alta prevalencia de cepas NT en aislamientos de leche de vacas con mastitis en nuestro país, así como la detección de una elevada proporción de los aislamientos que carecen incluso del “cluster” *cap5(8)* completo plantearon considerables dudas acerca del rol del PC en la patogénesis de la mastitis. El estudio del rol del PC se ha complicado porque muchos trabajos realizados anteriormente consideraron la producción de cápsula un rasgo permanente de la bacteria, ignorando los exquisitos sistemas de regulación con que cuenta *S. aureus* y que hoy se conocen mucho mejor (23). Podría ser que la expresión de PC sea necesaria en las primeras etapas de la enfermedad pero no en estadios más avanzados. Nuestros datos permitirían especular que de acuerdo a las manifestaciones clínicas, las cepas de *S. aureus* NT se aislarían con mayor frecuencia de bovinos con mastitis subclínica o crónica mientras que las cepas capsuladas parecerían provenir principalmente de casos de mastitis aguda.

La ausencia de los genes que codifican las proteínas necesarias para la producción de PC en especímenes clínicos de *S. aureus* podría constituir un evento extraordinario y limitado a un clon bacteriano, lo cual podría limitar el valor del hallazgo científico. Por el contrario, en base a los estudios realizados con cepas epidemiológicamente no relacionadas, la hipótesis de este trabajo de investigación postula que la pérdida de los genes que codifican para la síntesis de PC es el resultado de la expansión de un clon con dicha característica fenotípica que le confiere una cierta ventaja a la bacteria para persistir en el huésped. En este sentido, una observación a favor de esta hipótesis fue el hallazgo de que en todas las cepas analizadas la delección involucraba sólo al “cluster” *cap5(8)* y que las regiones adyacentes a dicho “cluster” se encontraron conservadas en todos los aislamientos.

En éste trabajo, se determinó en primera instancia, cuál podría ser la explicación del alto porcentaje de cepas *S. aureus* NT, incluso muchas de ellas con la delección del cluster *cap5(8)* y el reemplazo de éstos con un elemento de inserción de la familia IS6 (31). El 47% de las cepas bovinas de *S. aureus* investigadas produjeron una amplificación positiva con los cebadores *IScap-f* e *IScap-r*, indicando una relativa alta prevalencia de un elemento de inserción de la familia IS6 en los aislamientos clínicamente relevantes de Argentina. Dado el diseño de estos cebadores, este elemento podía ser *IScap* o *IS257*. La delección mediada por *IScap* fue hallada en el 55% de los aislamientos NT bovinos de *S. aureus* en donde la inserción de éste elemento sucedió en exactamente la misma posición y la delección produjo un fragmento de tamaño idéntico en todas las cepas analizadas. Está generalmente aceptado que la presencia de la *IS257* puede contribuir a la flexibilidad genética estafilocócica, aumentando la tasa de reordenamientos genéticos (111). Los eventos de recombinación y transferencia horizontal de elementos de inserción han jugado un rol importante en la evolución de las especies bacterianas (68). La transferencia horizontal produce genomas dinámicos en donde el ADN puede ser ingresado y delecionado del cromosoma (89).

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se ha sugerido que la delección de los genes de cápsula *cap5(8)* podría ser producto de una recombinación homóloga entre dos copias de *IScap* que flanquearan los genes que codifican el PC (24). Esta hipótesis sugiere que debería existir una cepa precursora de *S. aureus* que contenga el locus *cap5(8)* intacto y un mínimo de dos copias de *IScap*, por ejemplo, una en la región río arriba del gen *cap5(8)A* y otra copia dentro del gen *cap5(8)P* [éste gen no es esencial para la producción del PC (63)]. Estos precursores no han sido encontrados en la población de *S. aureus* investigada. De hecho, los experimentos de enriquecimiento in vivo no han producido variantes NT con la delección del “cluster” *cap* y la concomitante inserción del elemento *IScap*. En conjunto estos resultados, hablan a favor de la selección de un clon con la delección mediada por *IScap* más que un nuevo evento de recombinación ocurrido dentro del locus *cap* durante el transcurso de la infección.

Al mismo tiempo, se investigó si este reordenamiento genético podría estar relacionado con la existencia de una isla de patogenicidad. En el genoma de *S. aureus* se han descrito islas de patogenicidad que serían las responsables de la expresión de ciertos factores de virulencia (87). Dado que el PC interviene de alguna manera en la patogenia, podría ser que el reemplazo de los genes que codifican las enzimas para su síntesis por el elemento *IScap* sea un producto asociado a una isla de patogenicidad. Las islas de patogenicidad son regiones genómicas extensas (de 10 a 200 kb) que están presentes en los genomas de cepas patógenas y ausentes en los miembros no patogénicos de la misma especie, generalmente adquiridas por transferencia horizontal. En general, las islas de patogenicidad: a) contienen un porcentaje de G+C diferente al resto del genoma, b) presentan secuencias repetidas directas, c) en general se asocian a genes de ARN de transferencia (ARNt) en las cercanías ya que actúan como sitio de inserción, d) presentan integrasas u otros elementos móviles, y e) son generalmente inestables (43; 87). Se han encontrado diferentes islas de patogenicidad en el genoma de *S. aureus* aislado de bovinos y en algunos casos, flanqueados por secuencias directas

invertidas del elemento IS257 (124). El análisis realizado sobre las cepas *cap5(8)+* de Argentina, demostró que en ellas no existían estructuras que cumplieran con los requisitos necesarios para ser considerado una isla de patogenicidad. Tampoco se ha encontrado secuencias repetidas directas de la familia IS6 que pudieran dar indicios de un posible sitio de corte para una integrasa y el contenido de G+C fue similar al descrito para los genomas estafilocócicos. Asimismo, el “cluster” *cap* no fue escindido del genoma de la cepa PC5+ IS*cap*(e) en los experimentos que implicaran replicación del genoma (experimentos de enriquecimiento in vivo como in vitro) y no se ha hallado un gen que codificara para un ARNt cercano al locus *cap*. De hecho, el ARNt más cercano a *adhE* se encuentra a 140,21kb y ARNt más cercano a *aldA* esta a 31,1kb, lo que indicó que estos elementos no se encontraban en la cercanía de estos genes. En un trabajo reciente, se ha demostrado que la movilización del cassette SCC*mec* se debe a la presencia de recombinasas de sitio específico que son codificadas por los genes *ccrA* y *ccrB* y no por la presencia de las secuencias IS431 como se pensaba anteriormente (72). Este trabajo podría sugerir que el “cluster” *cap* podría ser movilizado por estas recombinasas y no específicamente por el elemento IS*cap*. Sin embargo, el análisis de las secuencias obtenidas por amplificación por PCR mediante cebadores orientados hacia fuera de IS*cap* no reveló una posible identidad con genes de recombinasas o integrasas halladas en *S. aureus* u otras especies bacterianas (Resultado no mostrado). Este análisis sugiere que este reordenamiento genético no tiene relación con la existencia de una isla de patogenicidad.

Mediante el análisis de “Southern blot”, se sugirió que el ancestro común de las cepas MBC204 y MBC214 y muchos de otros aislamientos hallados en Argentina que contiene la misma delección mediada por la IS*cap*, fueron *S. aureus cap5+*. Dado que las cepas PC5+ son más virulentas que las cepas que expresan PC8, la adquisición del elemento IS*cap* podría ser un mecanismo evolutivo mediante el cual podrían seleccionarse cepas menos agresivas pero más eficientes para lograr la persistencia en

el huésped. Al mismo tiempo, el análisis filogenético y la ausencia del elemento *IScap* en los aislamientos humanos, sugieren que la adquisición de las diferentes variantes de la familia IS6 por *S. aureus* podría tener relación con el tipo de huésped involucrado y su adaptación al mismo.

La IS257 ha sido encontrada en diversos contextos genéticos en estafilococos, algunos de los cuales están asociados a genes de resistencia a antimicrobianos (gentamicina, meticilina, tetraciclina y mupirocina, entre otros), desinfectantes y antisépticos (sales de amonio cuaternario), metales (cadmio y mercurio), o moléculas bioreactivas (proprilsostafin y factor de inmunidad lisostafin) (31). En la década del 90, la industria veterinaria introdujo en la Argentina, la utilización amplia en bovinos de cubiertas de pezones (“teat-dips”) que contienen sales de amonio cuaternario como antisépticos (E. Gentilini, Facultad de Veterinaria, UBA, comunicación personal). Sin embargo, la resistencia a meticilina, gentamicina o compuestos cuaternarios parecen no tener relación con la presencia de *IScap* en los aislamientos de *S. aureus* de Argentina, ya que los datos fenotípicos y genotípicos (test de difusión en placa o amplificación por PCR, respectivamente) obtenidos en éste trabajo no apoyan la hipótesis de selección del elemento IS por el uso de antibióticos o antisépticos.

El análisis de la secuencia del elemento IS hallado en nuestros aislamientos bovinos han mostrado que la *IScap(i)* (responsable de la delección del cluster *cap*) difiere en dos aminoácidos con respecto a *IScap(e)* encontrada en cepas de *S. aureus* genealógicamente diversas portadoras de un locus *cap5* intacto. Estas diferencias se debieron un cambio de un par de bases en la secuencia de ADN de la transposasa y originó una sustitución única en la transposasa del elemento *IScap*, en comparación con los elementos IS257 o IS431. Uno de los cambios (H por Y en la posición 74 de la secuencia aminoacídica) resultó en una sustitución conservativa que no pareció ser relevante para la funcionalidad de la transposasa. Al mismo tiempo, los motivos DDE se

mantuvieron conservados en la secuencia de la transposasa encontrada en las cepas bovinas investigadas, a pesar que la sustitución ocurrió dentro de la tríada aminoacídica que forma el sitio catalítico de la enzima (N2, N3 y C1). El otro cambio (N por D en la posición 86 de la secuencia aminoacídica) originó una sustitución no conservativa. Esta sustitución no se encontró en el sitio catalítico, por lo que podría carecer de efecto sobre la funcionalidad de la proteína. En favor de esta hipótesis, ambas sustituciones no parecieron alterar la transcripción de la transposasa ya que se obtuvieron transcritos de ambas transposasas, *IScap(e)* como de *IScap(i)* mediante RT-PCR. El significado de un potencial efecto que pudieran tener estas sustituciones halladas en *IScap(i)* e *IScap(e)* es incierto de acuerdo a la información con la que contamos actualmente.

La delección mediada por *IScap* de los genes *cap* fue frecuentemente encontrada en aislamientos bovinos clínicamente relevantes de Argentina (114). Otros mecanismos han sido descritos para explicar la pérdida de la expresión de cápsula en *S. aureus* (24). Sin embargo, el común denominador con alto significado es el hallazgo frecuente entre los aislamientos de *S. aureus* bovinos de Argentina y, con menor impacto, en el mundo entero, el alto porcentaje de aislamientos con pérdida permanente de la expresión de cápsula. Por lo tanto, las cepas de *S. aureus* que contienen la delección de los genes *cap* mediante la *IScap* representarían un clon, con un bagaje genético definido, que ha sido seleccionado positivamente por presentar ventajas adaptativas para la bacteria durante la infección del huésped. La diferencia en bagaje génico haría que la ausencia de cápsula en el clon encontrado en Argentina sea crucial, mientras que no sería crucial en el clon encontrado en los países nórdicos, por ejemplo, donde cepas que producen PC8 son altamente prevalentes sobre las NT (121). Interesantemente, en este trabajo de tesis se ha demostrado que una cepa que porta PC8 es menos inflamatoria que otra isogénica que portaba PC5. Dado el hallazgo de un alto porcentaje de cepas no capsuladas en Argentina, más allá del mecanismo genético responsable, y que dichos clones y subclones pudieran haberse seleccionado simplemente por su fenotipo NT, se estudió el

rol del PC en la patogénesis de *S. aureus* en la mastitis bovina, utilizando un modelo murino de mastitis.

El modelo murino de mastitis provee de una herramienta sumamente valorable para el estudio de la patogénesis de la infección por *S. aureus* dentro de la glándula mamaria (38). Este modelo ha sido validado recientemente por (17). La influencia de la producción de cápsula estafilocócica en este modelo reveló que las cepas capsuladas de *S. aureus* eran depuradas más rápidamente de la glándula mamaria con respecto a la cepa isogénica no capsulada. Mediante el análisis histopatológico se observó que los PMN eran reclutados a la glándula mamaria en mayor cantidad en respuesta a la infección por *S. aureus* PC5 o PC8, y que el influjo de esos PMN se correlacionaba con la depuración de la bacteria. En contraste, la cepa no capsulada de *S. aureus* indujo sólo una leve inflamación y fue depurada menos eficientemente de la glándula infectada. Los resultados de los estudios en células MAC-T in vitro, sugirieron que la cepa *S. aureus* no capsulada podría evadir la depuración por el sistema inmune mediante su internalización dentro de las células bovinas epiteliales mamarias. La inoculación con la cepa Reynolds (PC5) causó una reacción inflamatoria mayor en la glándula mamaria que la cepa Reynolds (PC8). Este hallazgo es interesante considerando un reporte reciente en donde se ha demostrado que la cepa Reynolds (PC5) era más virulenta en un modelo murino de bacteriemia que la cepa Reynolds (PC8) (129). Reynolds (PC5) y Reynolds (PC8) mostraron niveles comparables de virulencia en el modelo murino experimental de mastitis.

La patogénesis de la infección estafilocócica de la glándula mamaria es claramente distinta a la del modelo de bacteriemia. En éste último modelo las cepas de *S. aureus* de los serotipos capsulares 5 y 8 mostraron mayor resistencia a la opsonofagocitosis por leucocitos humanos y murinos que la cepa no capsulada (129). No hay evidencias hasta el momento que PC5 purificado o PC8 despierten una actividad

quimiotáctica intrínseca sobre las células PMN in vitro (J. Lee, dato no publicado) o que activen el sistema de complemento (129). Sin embargo, el PC8 purificado induce una respuesta inflamatoria localizada caracterizada por la infiltración de leucocitos PMN en un modelo murino de infección quirúrgica (J.C. Lee and A.O. Tzianabos. T cells and CXC chemokines modulate the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* wound infections. ASM General Meeting, New Orleans, May 23-27, 2004, Abstract D-145). La influencia de la producción de PC5 o PC8 en los niveles de quimiotácticos o inhibidores que regulan la migración de las células PMN dentro de la glándula mamaria aún no está claro y requiere investigaciones futuras (26). Es posible que la magnitud de la respuesta inflamatoria que ocurre en el sitio de infección pudiera determinar si una interacción particular entre *S. aureus* y la glándula mamaria derivan en una patología aguda o crónica. Aparentemente, PC5 y PC8 inducen el reclutamiento de PMN en el modelo murino de mastitis y esto podría influir sobre la interacción entre la bacteria y el huésped (27, 41). Las cepas isogénicas Reynolds -PC5 y Reynolds-PC8 causaron una infección aguda en ratones en lactación y la depuración de la infección bacteriana dependió de la integridad del tejido mamario. Asimismo, la infección persistente no fue observada cuando se administró un inóculo mixto que contenía ambos *S. aureus* capsulado y no capsulado, administrado a ratones en lactación. De acuerdo a éstos resultados, la significativa respuesta inflamatoria inducida por las cepas capsuladas de *S. aureus* sería la responsable de la depuración de las cepas de la glándula infectada.

Las condiciones óptimas para el estudio de la depuración de *S. aureus* de la glándula mamaria se alcanzaron con la inoculación de una dosis de 10^5 UFC. Con el inóculo de 10^6 UFC de *S. aureus* se observó una respuesta exacerbada del huésped que contribuyó al daño del tejido mamario y a la dificultad en la interpretación de los resultados. Como ocurre con muchos microorganismos, el daño tisular es dependiente en este caso también de la masa bacteriana presente en el órgano afectado. Las diferencias en la producción de cápsula entre cepas PC5 y PC8 en la patogénesis de la mastitis

bovina no han sido aún evaluadas. Los factores del huésped y los factores inherentes a la virulencia de *S. aureus* sumados a la cápsula probablemente afecten la interacción huésped-bacteria, lo que puede modificar la presentación de la enfermedad (infección clínica o subclínica) (80; 116).

La internalización de *S. aureus* en células epiteliales bovinas ha sido bien documentada (46). El ambiente intracelular podría proporcionar un nicho en el que *S. aureus* podría persistir y evadir su eliminación por los fagocitos profesionales y ciertos antibióticos (12). La interacción entre adhesinas expresadas en la superficie bacteriana (96) y los receptores del huésped son críticos para la internalización de *S. aureus* dentro de las células bovinas epiteliales (67; 112). Incluso, una mutante isogénica deficiente en la expresión de una proteína de unión a fibronectina (FnBP) exhibe una reducción del 30% en la capacidad de adherirse a células MAC-T en cultivo y un 95% de reducción en la invasión, comparada con una cepa salvaje (15; 29). Se ha demostrado asimismo que la expresión de PC reduce la adherencia de *S. aureus* a las células endoteliales y plaquetas in vivo (98, A. Risley, C. Cywes, T. Foster, and J. Lee, Abstr. 104th ASM General Meeting, abstr. D-254, 2004). Más aún, la dosis requerida para producir una infección por las cepas capsuladas de *S. aureus* son mayores que las que necesitan las cepas no capsuladas en un modelo de endocarditis (6), presumiblemente por enmascaramiento de adhesinas críticas para la unión de *S. aureus* a la válvula coronaria dañada. Los diferentes factores involucrados en la adhesión bacteriana y la invasión influyen en la patogénesis de la mastitis bovina por *S. aureus* en una revisión realizada por Kerro Deogo (61). Nuestros resultados indican que la producción de PC disminuye la internalización de *S. aureus* por las células MAC-T en un experimento in vitro. Sin embargo, la cápsula (tanto PC5 como PC8) no afectó la supervivencia bacteriana de *S. aureus* una vez internalizado. Estos resultados son consistentes con trabajos anteriores que demuestran que la producción de PC enmascara las adhesinas, dando por resultado una correlación negativa entre adherencia y PC (98).

La pérdida de la expresión de cápsula por *S. aureus* podría deberse a mutaciones en alguno de los genes del locus *cap*, mutaciones en el promotor, mutaciones dentro de algún loci regulatorio como *agr*, o una regulación por condiciones ambientales detectadas por *S. aureus* en las fases tempranas de la infección (93). *S. aureus* fracasa en la producción de PC durante la fase exponencial de crecimiento (73), en presencia de CO₂ en concentraciones $\geq 1\%$, o bajo condiciones alcalinas (47, 48). Se ha demostrado también una disminución en la expresión de PC durante la infección crónica estafilocócica de pulmón en pacientes con fibrosis quística (47). Las cepas de *S. aureus* no capsuladas internalizadas evaden a los leucocitos PMN y la eliminación por medio de éstos. La entrada de *S. aureus* dentro de las células del huésped a través de ciertos ligandos y sus receptores, podrían inducir la apoptosis (7), liberándose estafilococos viables hacia el entorno extracelular. Ciclos de internalización por las células epiteliales y subsiguiente aparición de cepas no capsuladas de *S. aureus* en el espacio extracelular podría derivar en la generación de un fenotipo bacteriano que posibilitaría la enfermedad crónica subclínica. Nuestros resultados no contradicen la premisa que el PC pueda jugar algún rol en la patogénesis de la mastitis de los rumiantes producida por *S. aureus* (49). PC5 y PC8 podrían participar junto a otros factores extracelulares en la patogénesis de la mastitis clínica aguda (76). Más aún, la capacidad de expresar o dejar de expresar PC durante la infección crónica le proporcionaría a la bacteria una ventaja adaptativa que le aseguraría la persistencia. De esta manera, una vez que la bacteria logra colonizar el tejido mamario, las condiciones de ese microambiente dadas por la respuesta inmune del huésped, favorecerían la selección positiva de variantes no capsuladas más eficientes en la persistencia. De hecho, en este trabajo se ha estudiado la posible reversión de mutantes NT a PC+ en un modelo de bacteremia y se ha observado una reversión de aproximadamente un 25% de la población. En conjunto estos resultados sugieren que la expresión de PC se relaciona con el microambiente generado por la respuesta del huésped.

Los resultados de este trabajo demuestran que un mutante no capsulado de *S. aureus* pudo persistir por más tiempo que las cepas isogénicas de los serotipos 5 y 8 en la glándula mamaria infectada de ratones en lactación. Las cepas capsuladas indujeron mayor inflamación que la mutante no capsulada y podrían contribuir al aumento de su depuración por parte del sistema inmune del huésped. Los estudios in vitro revelaron que el mutante no capsulado de *S. aureus* fue rápidamente internalizado por las células epiteliales bovinas con respecto a las células isogénicas capsuladas. En base a estos resultados, se puede especular que *S. aureus* podría persistir en el entorno intracelular de las células epiteliales dentro de la glándula infectada, donde se encuentra protegido de los fagocitos competentes. El mecanismo por el cual se incrementa la migración de los leucocitos PMN en respuesta a la infección por las cepas capsuladas de *S. aureus* es aún desconocido y requiere de futuros experimentos. Este hecho se suma a lo observado en las cepas obtenidas de los diferentes tambos en nuestro país, y a la aparición de cepas no capsuladas (generalmente portadoras del elemento *IScap*) que no se relaciona con la presión selectiva por el uso de antibióticos o antisépticos. La suma de estos resultados sugiere que cambios fenotípicos que pudieran ocurrir durante la infección podrían estar relacionados con presión selectiva ejercida por un componente de la respuesta inmune adaptativa. Por ese motivo se realizó un estudio para evaluar el rol de anticuerpos anti-cápsula en la emergencia de variantes no capsuladas.

Para evaluar esta hipótesis se inmunizaron grupos de ratones con anticuerpos anticápsula y a las 24 hs se inocularon ambas glándulas mamarias número 4 con 1×10^6 UFC. El primer resultado demostró que los anticuerpos específicos anticápsula de *S. aureus* son eficientes para la eliminación de un gran porcentaje de la población bacteriana de un inóculo intramamario. Interesantemente, se observó la aparición de cepas no capsuladas a partir del ciclo 4-6 de enriquecimiento, dependiendo de la cepa utilizada. Los resultados de estudios de preparados histopatológicos de las glándulas mamarias de los ratones tratados con anticuerpos demostraron que la población

bacteriana inoculada a medida que avanzaban los ciclos del experimento, producía menos lesión en el tejido. La explicación de estos resultados concuerda exactamente con la aparición de las cepas no capsuladas que producen menor daño en el tejido como se ha determinado en los experimentos anteriores. De hecho, la glándula permaneció funcional hacia los últimos ciclos de enriquecimiento tras la inoculación con las poblaciones bacterianas. Es decir que, a medida que pasaban los ciclos, la población bacteriana infectante se fue enriqueciendo en variantes NT produjeron la infección, pero no provocaron daño del tejido. Por otro lado, los preparados histopatológicos obtenidos de las glándulas mamarias de los ratones tratados con el suero no inmune, mostraron que el fenotipo de la población bacteriana inoculada era cada vez más agresiva, de hecho, en los últimos preparados la citoarquitectura del tejido se perdió totalmente y la funcionalidad del tejido se perdió.

De acuerdo a lo expuesto, se especula que la inmunización sistémica con una vacuna basada en la cápsula y subsecuente aparición de anticuerpos circulantes contra la cápsula, podría ser efectiva en los primeros estadios de la patogénesis de la mastitis bovina. Sin embargo, a largo plazo produciría la selección de cepas no capsuladas. Estas cepas como se demuestra en esta tesis, pueden evadir el sistema inmune del huésped derivando en una patología persistente. Una extrapolación de estos hallazgos a lo que ocurre durante una infección prolongada, permite suponer que la presencia de anticuerpos anticápsula eliminaría una gran proporción de la población bacteriana infectante, pero al mismo tiempo seleccionaría otra población menos virulenta, que accedería más fácilmente al medio intracelular favoreciendo la persistencia de un patógeno menos agresivo. Al mismo tiempo, los resultados de reversión de las cepas NT a PC+ en un modelo de bacteremia confirmaron que un 25% de la población bacteriana no capsulada puede revertir a PC+. En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con anticuerpos anti-PC5 induce la selección de una población que puede evadir el sistema inmune y permanecer en la glándula mamaria o pasar a circulación y

revertir a una cepa capsulada, derivando en una infección aguda o una diseminación a otros focos distantes. Esta podría ser la explicación del por qué de la falta de éxito en las vacunación con preparados diseñados para inducir altos títulos de anticuerpos anti-PC con capacidad opsónica.

El proceso de evolución de *S. aureus* dentro del huésped es continuo y, una vez, que la bacteria alcanzó el medio intracelular, se observó la aparición de una subpoblación con un fenotipo puntiforme dentro de la población bacteriana, que aumentó su proporción en forma lineal con respecto al número de ciclos en los experimentos de enriquecimiento. Las colonias puntiformes (del inglés “small colony variants”, SCV) fueron descritas en *S. aureus* en 1906 (64). El fenotipo SCV se caracteriza por lento crecimiento, con desarrollo de microcolonias, usualmente definidas como 10 veces más pequeñas que las de las cepas salvajes y poco activas metabólicamente. El fenotipo puntiforme encontrado en aislamientos clínicos tiene una alta tasa de reversión in vitro al fenotipo salvaje, sin dejar rastros de su fenotipo anterior, lo que dificulta su estudio y caracterización (100, 128).

La regulación de una subpoblación SCV es bastante compleja. Debido a que no pueden alcanzar un nivel alto de densidad de población, no pueden lograr el “quórum sensing” para la activación de genes como *agr*. Sin embargo, expresan otros factores como sigma B, que participa en la respuesta de stress de *S. aureus* y activa ciertos genes del virulón estafilocócico que define el fenotipo de las SCV. Se ha descrito que sigma B produce la sobreexpresión de proteínas de adhesión incrementando la expresión del factor de anclaje “clumping factor” y la proteína de unión a la fibronectina “fibronectin binding protein” que les permite lograr una internalización más eficiente (126). Asimismo, este regulador puede regular positivamente la expresión de los genes de cápsula y múltiples proteínas de superficie, aunque disminuye la producción de varias exotoxinas, favoreciendo la adherencia a células eucariotas e internalizándose en forma más eficiente

(78). La posible explicación del hecho que en las SCVs se observe la expresión de factores de la fase exponencial temprana (por ejemplo adhesinas) y tardía (por ejemplo PC), se debe a que el factor sigma-beta se mantiene sobreexpresado en forma estable, a diferencia de las cepas con fenotipo normal en los que sólo es activo en la fase tardía (78, 23)

Dentro de las infecciones persistentes, se ha visto que la mastitis bovina causada por *S. aureus* es difícil de erradicar por terapias antimicrobianas convencionales. En un estudio reciente, se ha investigado la persistencia del mutante *hemB* en la glándula mamaria murina bajo tratamiento antibiótico. Los resultados indicaron que a pesar que el mutante *hemB* tuvo una reducida habilidad para colonizar la glándula mamaria, pudo persistir in vivo la presión antibiótica (16). De hecho, una de las características de las SCVs de *S. aureus* es que son resistentes a gentamicina. En este trabajo hemos descubierto la aparición de mutantes puntiformes, cuyas colonias revirtieron al fenotipo salvaje al ser propagadas sobre agar. Este hecho es concordante con los trabajos descritos y se debe a que muchos de estos *S. aureus* SCV comienzan siendo mutantes regulatorios (100). No obstante, unas pocas colonias aisladas en ciclos avanzados de enriquecimiento mostraron un fenotipo más estable y pudieron ser mejor caracterizadas. Al mismo tiempo, se ha determinado mediante “colony immunoblot” que esta subpoblación puntiforme expresaba cápsula. Este hallazgo pareciera contradecir los resultados anteriores, en los que se ha visto que la falta de cápsula proporciona a *S. aureus* la ventaja de una eficiente internalización. Sin embargo, un análisis más cuidadoso revela que existirían mecanismos paralelos distintos para explicar estos fenómenos.

Tanto las cepas no tipificables como las variantes puntiformes fueron observadas en las glándulas mamarias obtenidas de ratones pre-tratados con anticuerpo anti-PC5 y no en las glándulas mamarias tratadas con el suero no inmune. Por lo tanto, ambas

variantes son seleccionadas por estos anticuerpos. En base a los resultados, nuestra hipótesis es que ante la presión selectiva por anticuerpo, la población bacteriana se enriquece en cepas no capsuladas que, al carecer del polisacárido capsular, poseen mayor exposición de sus adhesinas. Las SCVs aparecen como otra estrategia de supervivencia: no dejan de expresar cápsula pero sobreexpresan adhesinas. De esta manera, podría ser posible que un número de SCVs permaneciera asociadas a las cepas NT mediante estas adhesinas y que utilice a estas últimas como una especie de facilitador para su acceso hacia el medio intracelular. Ambos fenotipos, NT y SCV, una vez internalizados, producen menos toxinas derivando en la persistencia o supervivencia intracelular de la bacteria. Estas SCV podrían estar produciendo poco o nula cantidad de PC in vivo, y una cantidad detectable in vitro. Si la permanencia intracelular dentro del huésped es lo suficientemente larga (como ocurre en las patologías crónicas persistentes), no sorprende entonces que hacia el final de nuestros experimentos hayamos podido encontrar fenotipos SCV estables.

En síntesis, el análisis genómico del locus *cap* en aislamientos bovinos de *S. aureus* de Argentina, reveló la presencia de una variante de la IS257 denominada IS*Scap*. Estos hallazgos sostienen la hipótesis de que esta variante podría haber sido adquirida en tiempos ancestrales y haya evolucionado con el genoma de *S. aureus* desde ese momento. La alta prevalencia podría deberse a que las cepas que contienen esta delección son NT. Estas cepas no fueron producto de una presión selectiva derivada del uso de ciertos antimicrobianos o antisépticos por la industria veterinaria. Hemos demostrado que los anticuerpos contra el PC contribuyen a la selección de cepas no capsuladas. La pérdida de expresión de PC por *S. aureus*, independientemente del mecanismo que las origina, tiene una cierta ventaja adaptativa. Los estudios in vivo demuestran que la mutante no capsulada de *S. aureus* pudo persistir por más tiempo que las cepas isogénicas de los serotipos 5 y 8 en la glándula mamaria infectada de ratones en lactación. Las cepas capsuladas indujeron mayor inflamación que la mutante no

capsulada, contribuyendo al aumento de su depuración por parte del sistema inmune del huésped. Los estudios *in vitro* en células MAC-T revelaron que el mutante no capsulado de *S. aureus* fue rápidamente internalizado por las células epiteliales bovinas con respecto a las células isogénicas capsuladas. Nosotros especulamos que *S. aureus* podría persistir en el entorno intracelular de las células epiteliales dentro de la glándula infectada, donde se encuentra protegido de los fagocitos competentes y demás células del sistema de defensa del huésped. Para esto, el genoma bacteriano ha evolucionado para lograr una interacción en el huésped que garantice su persistencia y propagación a otros nichos ecológicos. La falta de expresión de cápsula mediante la *IScap* podría ser una de las estrategias particulares de los clones prevalentes de la Argentina para evadir el sistema inmune. Asimismo, la evolución de la adaptación de las cepas estafilocócicas continúa ya que se seleccionan subpoblaciones puntiformes, reconocidas como un marcador de persistencia. Tanto las NT como las SCV (16) serían menos eficientes en la colonización e invasión pero más eficaces en la persistencia una vez alcanzado el sitio de infección. Este hecho podría sugerir que en la mastitis bovina, el rol de la cápsula está relacionado con las diferentes etapas de esta patología. De esta manera, la población bacteriana estaría enriquecida en cepas capsuladas en los primeros estadios de la enfermedad y en mutantes no capsulados o SCV en las etapas tardías, derivando en una patología más persistente. Esto significa que la población estafilocócica es dinámica y sufre cambios fenotípicos (de origen regulatorio o no, originados por el microambiente en el que se encuentra) que le permiten invadir, colonizar y persistir en el huésped más eficientemente, evadiendo las acciones del sistema inmune y de los antimicrobianos.

La importancia de este trabajo radica fundamentalmente en su aporte al conocimiento de la infección persistente por *S. aureus*, de aplicación a la patogénesis de la mastitis bovina subclínica producida por esta bacteria. La información obtenida permitirá mejorar el diseño racional de vacunas y la terapéutica utilizada, a fin de lograr una eficaz prevención y tratamiento de ésta infección, como así también de otras

patologías crónicas o persistentes producidas por éste microorganismo. Estudios futuros permitirán establecer con certeza los componentes más adecuados a tener en cuenta para el diseño racional de vacunas como así también la extrapolación de éstos resultados a otras patologías estafilocócicas persistentes o crónicas.

Conclusiones

CONCLUSIONES PARCIALES

1. Se demostró que un 55% de las cepas NT carecían del “cluster” *cap5(8)*, contenían la *IScap*, y el reordenamiento genético fue idéntico al observado en las cepas prototípicas. Este resultado sugiere que las cepas prototípicas no mostraban un hecho aislado sino que ese reordenamiento se repetía en cepas epidemiológicamente no relacionadas y que fue seleccionado positivamente, quizás por encontrarse asociado a cierta ventaja adaptativa para la bacteria. De hecho, estas cepas pertenecen a uno de los subclones más prevalentes de nuestro país.
2. En base a los resultados se sugirió que el ancestro común de las cepas MBC204 y MBC214 y muchos de otros aislamientos hallados en Argentina que contiene la misma delección mediada por la *IScap*, fueron *S. aureus cap5+*. El análisis filogenético reveló que la adquisición de las diferentes variantes de la familia IS6 podría tener relación con el tipo de huésped involucrado y la adaptación al mismo. De acuerdo a las características observadas en la *IScap* interna y externa, podríamos sugerir que la *IScap* insertada en el locus *cap* ha evolucionado en un linaje cercano pero diferente.
3. Ambas transposasas [*IScap(i)* e *IScap(e)*] se transcriben a pesar de las mutaciones halladas en el análisis de las secuencias aminoacídicas. Este hecho podría sugerir entonces que las transposasas codificadas por los elementos *IScap(i)* e *IScap(e)* podrían ser funcionales.
4. Las cepas MB094, MB113 y las 13 cepas adicionales, que fueron investigadas, no poseían el elemento IS en la vecindad del “locus” *cap*. Estas cepas representan

todos los aislamientos dentro de la colección de 68 cepas que poseen el “locus” *cap* y al menos una copia del elemento de inserción. Por lo tanto, no serían precursores del reordenamiento genético observado en el 55% (24/44) de las cepas NT de nuestra colección. Estos hallazgos sugieren que los eventos genéticos que llevan a la pérdida del “cluster” *cap* han ocurrido en tiempos ancestrales y todos los intermediarios, cromosómicos o plasmídicos, no han sido seleccionados positivamente y se han perdido.

5. El análisis de la secuencia obtenida de los aislamientos humanos como el estudio filogenético de la secuencia aminoacídica de los distintos elementos de inserción, sugieren que *IScap* podría no ser relevante en aislamientos de *S. aureus* humanos y que las diferencias observadas entre la *IScap* y las secuencias *IS257* e *IS431* podrían deberse a características relacionadas con la especificidad de ciertos clones *S. aureus* por distintos huéspedes (por ejemplo, humanos vs. bovinos).
6. La presencia del elemento *IScap* no fue seleccionada por factores como antibióticos o sales de amonio cuaternario, asociados a la *IS257*. Por lo tanto, la presencia de éste elemento podría estar originada por otro factor de selección o ser el producto de una adquisición por transferencia horizontal que proporcione alguna característica especial al clon prevalente estafilocócico de bovinos y sea parte del proceso evolutivo del mismo. No puede descartarse en esta etapa del trabajo que el factor de selección mencionado sea un componente de la respuesta inmune del huésped dirigido contra la cápsula.
7. La cepa Reynolds (NT) demostró poseer una capacidad de persistir en números más altos en la glándula mamaria, mientras que las cepas capsuladas Reynolds (PC5) y Reynolds (PC8) fueron eliminadas más rápidamente que la no capsulada.

Por otro lado, el efecto de las mezclas entre Reynolds (PC5 u 8) y Reynolds (NT) fue similar al observado por cada cepa capsulada en forma individual. Esto significa el 50% de la población de capsulada de la mezcla es suficiente para que el sistema inmune del huésped reconozca a esta población como 100% capsulada y sea eliminada en forma similar al patrón observado para Reynolds (PC5) o Reynolds (PC8) en forma individual.

8. Nuestro análisis histológico reveló que las células PMN fueron reclutadas a la glándula mamaria en alta cantidad en respuesta a la infección por *S. aureus* PC5+ o PC8+, y éste influjo de PMN se correlacionó con la mayor depuración de éstas cepas, aunque con mayores alteraciones histopatológicas.
9. Los resultados in vitro sugirieron que *S. aureus* no capsulado era internalizado más eficientemente que las cepas capsuladas. Se especula que así *S. aureus* podría evitar la depuración mediada por una respuesta inmune adaptativa mediante la internalización dentro de las células epiteliales mamarias bovinas.
10. El tratamiento de una cepa productora de PC5 con anticuerpos anti-PC5 produce la selección de variantes NT con un cambio genético permanente, el cual puede producirse sin la presencia de éste elemento de inserción. La presencia de la IScap (e) no se asoció a la generación de una deleción total del “cluster” *cap* como la descrita en la cepa prototípica bovina MBC204.
11. Se demostró que la presencia de anticuerpos específicos anticápsula de *S. aureus*, son eficientes para la eliminación de un gran porcentaje de la población bacteriana de un inóculo intramamario.

12. La presencia de anticuerpo circulante anticápsula puede seleccionar positivamente cepas NT de *S. aureus* en la glándula mamaria. Asimismo, las cepas NT obtenidas no cuentan con otros cambios fenotípicos como la producción de hemólisis y producción de biopelícula. Por lo tanto, estas cepas no portarían mutaciones a nivel regulatorio de la expresión de factores de virulencia.

13. La aparición de variantes puntiformes en las placas obtenidas de glándulas mamarias de ratones tratados con anticuerpo específico anti-PC, podría ser resultado de mutaciones regulatorias a otro nivel del observado en los derivados NT. Estas variantes puntiformes son producto del tratamiento con anticuerpo, por lo tanto, la presencia de anticuerpo circulante anticápsula estaría seleccionando no sólo cepas no capsuladas, sino también subpoblaciones con otras características fenotípicas con mayores ventajas para la permanencia de la bacteria. Estos resultados podrían ser una explicación para la persistencia de *S. aureus* en la glándula mamaria.

14. El tratamiento con suero anti-cápsula disminuye el número de bacterias, como fue determinado anteriormente, pero que también selecciona variantes NT. Estas producen menor daño del tejido y son más eficaces en la evasión del sistema inmune. Asimismo, la disminución de UFC que produce la presencia de anticuerpo anti-PC5 no es la causa de un menor daño en la glándula mamaria ya que los valores iniciales en presencia y ausencia del anti-PC5 son similares. Por el contrario, éstos son producidos por el fenotipo bacteriano que es seleccionado por este factor. A pesar que la estructura de la glándula mamaria es regenerada, se siguen aislando *S. aureus* pero son NT. Por lo tanto, la presencia de anticuerpo específico anti-PC circulante podría ser un requerimiento para que una infección aguda intramamaria derive en una patología persistente.

15. El PC de *S. aureus* es necesario como factor de virulencia de acuerdo al microambiente en que se encuentre la bacteria. Por lo tanto, las cepas no capsuladas de *S. aureus* siguen constituyendo durante el transcurso de la infección un riesgo epidemiológico ya que pueden evadir al sistema inmune y permanecer en la glándula mamaria o pasar a circulación y revertir a una cepa capsulada, derivando en una infección aguda o una diseminación hacia focos distantes.

CONCLUSIÓN GENERAL Y FUTURO

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron demostrar que el mecanismo más factible para explicar la elevada prevalencia de *S. aureus* no capsulados en bovinos de nuestro país fue la selección positiva de un clon ampliamente diseminado en nuestra cuenca lechera. Tal clon de cepas NT contiene IScap y una mejor adaptación al huésped. Asimismo, se ha descrito cuales son las ventajas adaptativas de las cepas no capsuladas en la patogénesis de la mastitis bovina. Hasta el presente no se cuenta con una vacuna efectiva de uso práctico que permita prevenir las infecciones intramamarias por *S. aureus*. Es importante recalcar que la mayoría de las vacunas experimentales propuestas contra *S. aureus* contenían extractos de PC, o PC5 purificado, con el propósito de inducir, mediante la vacunación, anticuerpos contra antígenos capsulares capaces de aumentar la opsonofagocitosis. Los estudios propuestos en esta investigación permitieron comprender que el uso de este tipo de vacuna podría estar favoreciendo la aparición de cepas NT, desencadenando la persistencia de *S. aureus* y la transición de una patología aguda a una crónica. Estudios futuros permitirán establecer con certeza los componentes necesarios para el diseño racional de una vacuna efectiva contra *S. aureus* que pueda prevenir patologías agudas como crónicas producidas por este microorganismo.

Lic. Lorena Tuscherr

Dr Daniel O. Sordelli
Director de Tesis Doctoral

Bibliografia

1. Anderson J.C. 1982. Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunization and therapy. *Vet. Rec.* 110:372-376.
2. Anderson J.C. 1983. Veterinary aspects of staphylococci, pp. 193-241. En: *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 1: Clinical and epidemiological aspects. Easmon C.S.F., Adlam C. (ed). Academic Press, London.
3. Arvidson S, Tegmark K. 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* May; 291(2):159-70. Review
4. Arrecubieta, C and Lowy, F. 2006. *Staphylococcus aureus*–Eukaryotic cell interactions, p. 517-525. En V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
5. Bach, M.C., S.H. Zinner, C. Wilcox, and M. Finland. 1972. Efficacy of standard disc diffusion test as applied to susceptibility of *Staphylococcus aureus* to tetracycline and minocycline. *J. Lab. Clin. Med.* 79:316-325.
6. Baddour L.M., Lowrance C., Albus A., Lowrance J.H., Anderson S.K., Lee J.C. 1992. *Staphylococcus aureus* microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.* 165:749-753,
7. Bayles K.W., Wesson C.A., Liou L.E., Fox L.K., Bohach G.A., Trumble W.R. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:336-342.
8. Berg, D.E., Davies J., Allet B. and J.D. Rochaix. 1975. Transposition of R factor genes to bacteriophage lambda. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 72:3628-3632
9. Bhasin N., Albus A., Michon F., Livolsi P.J., Park J.S., J.C. Lee. 1998. Identification of a gene essential for O-acetylation of the *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* 27: 9-21.
10. Bhasin N., Kiser K.B., Deng L., Lee J.C. 1998. Purification and biochemical characterization of UDP-GlcNAc-2-epimerase encoded by cap5P gene of *Staphylococcus aureus* type 5 Reynolds, abstr. B-415. Abstr. 98th. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Bohach, G. 2006. *Staphylococcus aureus* exotoxins, p. 464-477. En V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
12. Bradley A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164:116-28
13. Bramley A.J., King J.S., Higgs T.M., Neave F.K. 1979. Colonization of the bovine teat duct following inoculation with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Br. Vet. J.* 135:149-162.
14. Bramley A.J., Dodd F.K. 1984. Reviews of the progress in dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J. Dairy Res.* 51:481-512.

15. Brouillette, E, B. Talbot, and F. Malouin. 2003. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect. Immun.* 71:2292-2295.
16. Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. 2004. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* May 1, 41(1):35-41.
17. Brouillette E, Malouin F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes Infect.* Mar;7(3):560-8.. Review
18. Buzzola F.R., Quelle L., Gómez M.I., Catalano M, Steele-Moore L., Berg D, Gentilini E, Denamiel G., Sordelli D. 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect* 126: 445-452.
19. Buzzola FR, Barbagelata MS, Caccuri RL, Sordelli DO. 2006. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA mutant in mice. *Infect Immun.* Jun; 74 (6):3498-506.
20. Calzolari A., Giraudo J.A., Rampone H., Odierno L., Giraudo A.T., Frigerio C., Bettera S., Raspanti C., Hernández J., Wehbe M., Mattea M., Ferrari M., Larriestra A., Nagel R. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis: Evaluation in two commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 80:854-858.
21. Castagliuolo I, Piccinini R, Beggiao E, Palu G, Mengoli C, Ditadi F, Vicenzoni G, Zecconi A. 2006. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine.* May 15;24 (20):4393-402.
22. Chandler R.L. 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 3:273-282,
23. Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H, Xiong YQ. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Jan 15; 40 (1):1-9. Review
24. Cocchiario, J.L., M.I. Gómez, A. Risley, R. Solinga, D.O. Sordelli, and J.C.Lee. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. *Molec. Microbiol.* 59:948-960.
25. Cunnion KM, Lee JC, Frank MM. 2001. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* Nov;69(11):6796-803
26. de Haas, C.J.C., K.E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W.J.B Van Wamel, E.C.J.M. Heezius, Myriam J.J.G. Poppelier, K.P.M. Van Kessel, and J.A.G. van Strijp. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.* 199:687-695.
27. Dettelleux, J.C. 2004. Neutrophils in the war against *Staphylococcus aureus*: predator-prey models to the rescue. *J. Dairy Sci.* 87:3716-3724.
28. Dubin G. 2002. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol Chem.* Jul-Aug, 383 (7-8):1075-86. Review

29. Dziwanowska, K., Patti J.M., Deobald C.F, Bayles K.W, Trumble W.R., and Bohach G.A. 1999. Fibronectin-binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67:4673-4678.
30. Ferens W.A., Bohach G.A. 2000. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: Superantigens and internalization by host cells. *J. Lab. Clin. Med.* 135:225-230.
31. Firth, N, and Skurray, R.A. 2006. Genetics: accessory elements and genetic exchange, p. 413-426. *En V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), Gram-positive pathogens, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.*
32. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. 2006. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol.* Jun; 4 (6):445-57. Review
33. Foster T.J. 1991. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 9:221-227.
34. Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol.* Dec;3(12):948-58. Review
35. García V.E., Gómez M.I., Iglesias M.F., Sanjuan N., Gherardi M.M., Cerquetti M.C. y Sordelli D.O. 1996. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 14:45-51.
36. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J. 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet.* Mar 2; 359 (9308):753-9.
37. Giraud J.A., Calzolari A., Rampone H., Rampone A., Giraud A.T., Bogno C., Larriestra A., Nagel R. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis: Evaluation in heifers. *J. Dairy Sci.* 80:845-853.
38. Gómez, M.I., García V.E., Gherardi M.M., Cerquetti M.C, and. Sordelli, D.O. 1998. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus* protects mice from experimental mastitis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20:21-27.
39. Gómez MI, Sordelli DO, Buzzola FR, Garcia VE. 2002. Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. *Infect Immun.* Aug; 70(8):4254-60.
40. Gómez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, Cheung A, Prince A. 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat Med.* Aug;10 (8):842-8.
41. Gresham H.D., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L., Lindberg F.P. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* 164:3713-3722.

42. Guidry A., Fattom A., Patel A., O'Brien C., Shepherd S., Lohuis J. 1998. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 59:1537-1539.
43. Hacker, Jorg; Kaper, James B. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev.* 54:641-79
44. Han H.R., Pak S. 2nd, Guidry A. 2000. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. *J. Vet. Med Sci* 62 (12):1331-3.
45. Haren L, Ton-Hoang B, Chandler M. 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Annu Rev Microbiol.* 53:245-81.
46. Hebert, A., K. Sayasith, S. Senechal, P. Dubreuil, and J. Lagace. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett* 193:57-62.
47. Herbert, S., D. Worlitzsch, B. Dassy, A. Boutonnier, J.M. Fournier, G. Bellon, A. Dalhoff, and G. Doring. 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* 176:431-438.
48. Herbert, S., S.W. Newell, C. Lee, K.P. Wieland, B. Dassy, J.M. Fournier, C. Wolz, and G. Doring. 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides by CO₂. *J. Bacteriol.* 183:4609-4613
49. Hensen S.M., Pavicic M.J.A.M.P; Lohuis J.A.C.M.; De Hoog J.A.M., Poutrel B. 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci* 83: 1966-1975.
50. Herron-Olson, L, J.M. Musser and V. Kapur. 2005. Whole-genome sequencing and comparative analysis of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* (bases 1 to 2742531, NCBI Genome Project, Natl. Center Biotechnol. Information, NIH, Bethesda, MD 20894. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=82749777>)
51. Herron, L.L., Chakravarty, R., Dwan, C., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Retzel, E., and Kapur, V. 2002. Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70:3978-3981
52. Higgins J, Loughman A, van Kessel KP, van Strijp JA, Foster TJ. 2006. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol Lett.* May; 258 (2):290-6.
53. Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell

- BG, Spratt BG, Parkhill J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 29; 101 (26):9786-91.
54. Holderbaum D., Hall G.S., Ehrhart L.A. 1986. Collagen binding to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 54:359-364.
 55. Huynh HT, Robitaille G, Turner JD. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Exp Cell Res. Dec*; 197 (2):191-9.
 56. Jones C. 2005. Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. *Carbohydr Res.* May 2; 340 (6):1097-106.
 57. Jonsson P., Lindberg M., Haraldsson I., Wadstrom T. 1985. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Infect. Immun.* 49:765-769.
 58. Kampen AH, Tollersrud T, Lund A. 2005. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro. *Infect Immun.* Mar; 73 (3):1578-83.
 59. Karakawa, W.W. and Vann, W. F. 1982. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus* *Semin Infect Dis* 4: 285-93.
 60. Kenny K., Tollersrud. T. 1999. Questions uniqueness of surface polysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 60: 530.
 61. Kerro Dego, O., van J.E. Dijk, and H. Nederbragt. 2002. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet. Q.* 24:181-198.
 62. Kerro-Dego O, Prysliak T, Potter AA, Perez-Casal J. 2006. DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol.* Sep 15; 113 (1-2):125-38.
 63. Kiser KB, Bhasin N, Deng L, Lee JC. 1999. *Staphylococcus aureus cap5P* encodes a UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase with functional redundancy. *J Bacteriol.* Aug, 181 (16):4818-24.
 64. Kolle W, Hesch H. 1906. Die experimentelle Bakteriologie und die infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der immunitaslehre. Ein Lehrbuch für studierende ärzte und medizinbeamte. Berlin, Urban and Schwarzenber.
 65. Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N.K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hiramatsu, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357:1225-1240.

66. Kuusela P. 1978. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. *Nature* 276:718-720.
67. Lammers, A.; Nuijten, P.J; and. Smith, H.E. 1999. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol. Letters* 180:103-109.
68. Lawrence JG, Ochman H, Hartl DL. 1992. The evolution of insertion sequences within enteric bacteria. *Genetics*. May; 131 (1):9-20.
69. Lee JC, Liu MJ, Parsonnet J, Arbeit RD. 1990. Expression of type 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin 1 are associated among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. Dec;28 (12):2612-5.
70. Lee JW, O'Brien CN, Guidry AJ, Paape MJ, Shafer-Weaver KA, Zhao X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can J Vet Res*. Jan;69 (1):11-8.
71. Lee C.Y., Lee J.C. 2006. Staphylococcal capsule, p. 456-463. *In* V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
72. Lina G, Durand G, Berchich C, Short B, Meugnier H, Vandenesch F, Etienne J, Enright MC. 2006. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis. *Clin Microbiol Infect*. Dec;12 (12):1175-84.
73. Luong TT, Lee CY. 2002. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infect Immun*. Jul; 70 (7):3389-95.
74. Mahillon J, Chandler M. 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62:725-774.
75. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. Mar; 36 (3):618-23.
76. Matsunaga, T., Kamata S., Kakiichi N., and Uchida K. 1993. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J. Vet.. Med. Sci*. 55:297-300.
77. McGavin M.J., Zahradka C., Rice K., Scott J.E. 1997. Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. *Infect Immun* 65(7):2621-2628.
78. Moisan H, Brouillette E, Jacob CL, Langlois-Begin P, Michaud S, Malouin F. 2006. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J Bacteriol*. Jan;188 (1):64-76.
79. Mollet, B., S. Iida, and W. Arber. 1985. Gene organization and target specificity of the prokaryotic mobile genetic element IS26. *Mol.Gen.Genet*. 201:198-203.

80. Mullarky, I.K., C. Su, N. Frieze, Y.H. Park, and L.M. Sordillo. 2001. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infect. Immun.* 69:45-51.
81. Nemeth J., Lee J.C. 1995. Antibodies to capsular polysaccharides are not protective against experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Infect. Immun.* 63: 375-380.
82. Nickerson S. 1993. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet. Med.* 4:368,
83. Nickerson S.C., Owens W.E., Bodde R.L. 1995. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.* 78:1607-1618.
84. Nilsson I.M., Lee J.C., Bremell T., Ryden C., Tarkowski A. 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect. Immun.* 65: 4216-4221.
85. Norden, W. Osteomyelitis. 1991. En: *Enfermedades Infecciosas: Principios y Práctica*. Mandell, Douglas, Bennett. Ed. Panamericana; Buenos Aires; pp: 972-980.
86. Nordhaug M.L., Nesse L.L., Norcross N.L., Gudding R. 1994. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J. Dairy Sci.* 77:1267-1275.
87. Novick RP. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* Mar;49 (2):93-105. Review.
88. Novick, R. 2006. Staphylococcal pathogenesis and pathogenicity factors, p. 496-516. En V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-positive pathogens*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
89. Ochman H. 2001. Lateral and oblique gene transfer. *Curr Opin Genet Dev.* Dec; 11(6):616-9. Review.
90. Ochman H, Davalos LM. 2006. The nature and dynamics of bacterial genomes. *Science.* Mar 24; 311 (5768):1730-3. Review
91. Oliver, S.P., R. A. Almeida, M. J. Lewis, B. E. Gillespie, y H. H. Dowlen. 1999. Prevalencia de mastitis en vaquillonas y estrategias para su control. En: *Memorias Jornadas ALMAST'99 Calidad de Leche y Mastitis*, Villa María, Córdoba. Pp. 14-28.
92. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. 2004. Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R. *Infect Immun.* Jun; 72 (6):3664-7.
93. O'Riordan K., and J.C. Lee. 2004. *Staphylococcus* capsular polysaccharide. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:218-234.

94. Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. 2006. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem.* Jan 13; 281 (2):1179-87.
95. Patel A.H., Nowlan P., Weavers E.D., Foster T. 1987. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect. Immun.* 55:3103-3110.
96. Patti, J.M., B.L. Allen, M.J. McGavin, and M. Hook. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:585-617.
97. Pitcher D.G., N.A. Saunders, and R.J. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8:151-156.
98. Pohlmann-Dietze, P., M. Ulrich, K.B. Kiser, G. Doring, J.C. Lee, J.M. Fournier, K. Botzenhart, and C. Wolz. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of the capsular polysaccharide, the global regulator *agr*, and the bacterial growth phase. *Infect. Immun.* 68:4865-4871.
99. Phonimdaeng P., O'Reilly M., Nowlan P., Bramley A.J., Foster T.J. 1990. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site specific coagulase-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* 4:393-404.
100. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* Apr;4(4):295-305. Review.
101. Projan S.J., Novick R.P. 1997. The molecular basis of pathogenicity, pp 55-81. *En: The staphylococci in human disease.* Crossley K.B., Archer G.L. (Ed). Churchill Livingstone Inc., NY.
102. Rainard P, Riollot C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet Res.* May-Jun;37 (3):369-400. Epub 2006 Feb 23. Review
103. Rezsohazy R., Hallet B., Delcour J., Mahillon J. 1993. The IS4 family of insertion sequences: evidence for conserved transposase motif. *Mol. Microbiol.* 9:1283-1295.
104. Rick P.D., Silver R.P. 1996. Enterobacterial common antigen and capsular polysaccharides, pp: 104-122. *In: Escherichia coli y Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd. Ed. F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E. Umbarger. ASM Press, Washington, D.C.
105. Roghmann M, Taylor KL, Gupte A, Zhan M, Johnson JA, Cross A, Edelman R, Fattom AI. 2005. Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. *J Hosp Infect.* Jan; 59(1):27-32.
106. Rooijackers SH, van Wamel WJ, Ruyken M, van Kessel KP, and van Strijp JA. 2005. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.* Mar; 7(3):476-84.
107. Sau S., Lee C.Y. 1996. Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178: 2118-2126.

108. Sau S., Bhasin N., Wann E.R., Lee J.C., Foster T.J., Lee C.Y. 1997. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type – specific genes flanked by common genes. *Microbiology* 143: 2395-2405.
109. Shaw L, Golonka E, Potempa J, Foster SJ. 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. Jan;150(Pt 1):217-28.
110. Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P. 2004. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*. Nov 15; 23(1):114-26.
111. Simpson, A.E; Skurray R.A, and Firth N. 2000. An IS257-derived hybrid promoter directs transcription of a *tetA(K)* tetracycline resistance gene in *Staphylococcus aureus* chromosomal *mec* region. *J. Bacteriol.* 182:3345-3352.
112. Sinha. B., P. Francois, Y.A. Que, M. Hussain, C. Heilmann, P. Moreillon, D. Lew, K.H. Kraus, G. Peter, and M. Herrmann. 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68:6871-6878.
113. Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z. 1985. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol.* Nov; 22(5):828-34.
114. 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., Lee J.C. 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38:846-850.
115. Sordillo LM, hafer-weaver K., DeRosa D. 1997. Symposium: Bovine Immunology. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865.
116. Sutra L., Poutrel B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89.
117. Taverna F, Negri A, Piccinini R, Zecconi A, Nonnis S, Ronchi S, Tedeschi G. 2006. Characterization of cell wall associated proteins of a *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis case by a proteomic approach. *Vet Microbiol.* Oct 12; [Epub ahead of print]
118. Tenover, F and Gorwitz, R. 2006. The epidemiology of *Staphylococcus* infections, p. 526-534. *En V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), Gram-positive pathogens, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.*
119. Tollersrud T., Kenny K., Reitz A., Lee J.C. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *S. aureus* and other *Staphylococcus* spp from Europe and the United States. *Infect. Immun.* 38:2998-3003.

120. Tollersrud T., Zernichow L., Andersen S.R., Kenny K., Lund A. 2001. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine* 19: 3896-3903.
121. Tollersrud T, Norstebo PE, Engvik JP, Andersen SR, Reitan LJ, Lund A. 2002. Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. *Vet Res Commun. Dec*;26 (8):587-600.
122. Tollersrud T, Kampen AH, Kenny K. 2006. *Staphylococcus aureus* enterotoxin D is secreted in milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. *Infect Immun. Jun*;74 (6):3507-12.
123. Tzianabos AO, Wang JY, Lee JC. 2001. Structural rationale for the modulation of abscess formation by *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A. Jul* 31; 98 (16):9365-70.
124. Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C, Trotonda P, Foster TJ, Lasa I, Penades JR. 2003. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol. Jul*; 49(1):193-210.
125. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis. Aug*;9(8):978-84.
126. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, Proctor RA, McNamara PJ, Peters G, Von Eiff C. 2002. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect Immun. Oct*; 70(10):5428-37.
127. von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, Rolauuffs B, Lindner N, Winkelmann W, Peters G. 1997. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis. Nov*;25 (5):1250-1.
128. von Eiff C, Peters G, Becker K. 2006. The small colony variant (SCV) concept - the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury. May*;37 Suppl 2:S26-33.
129. Watts J.A., D. Ke, Q. Wang, A. Pillay, A. Nicholson-Weller, and J.C. Lee. 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. *Infect. Immun. 73*:3502-3511.
130. Watson D.L., Watson N.A. 1989. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Res. Vet. Sci. 47*: 152-157.
131. Watson D.L. y col. 1990. A field trial to test the efficacy of a *Staphylococcal* mastitis vaccine in comercial dairies in Australia, pp. 438-443. *Proc. Intl. Symp. Bov. Mastitis, National Mastitis Council, and the AABP, West Lafayette, Ind.,.*
132. Watson DL, McColl ML, Davies HI. 1996. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Aust Vet J. Dec*;74(6):447-50.

133. Willet H. 1986. Estafilococo; pp: 519-540. En: Microbiología, Zinsser. Joklik, Willet, Amos, 18ª edición. Ed. Panamericana; Buenos Aires.
134. Yancey R.J. Jr. 1999. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv. Vet. Med.* 41:257-273.
135. Yamaguchi T, Hayashi T, Takami H, Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, Asakawa K, Ohara M, Komatsuzawa H, Sugai M. 2001. Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun* 69:7760-7771.
136. Zecconi A, Cesaris L, Liandris E, Dapra V, Piccinini R. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb Pathog. Apr*;40(4):177-83. Epub 2006 Mar 6.