

Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias



Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA), Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL)/Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Tesis para optar por el grado académico de Doctora en Ciencias Veterinarias.

“Caracterización de cepas de Staphylococcus aureus asociadas a infecciones transitorias y persistentes en la glándula mamaria bovina: estudios inmunológicos, moleculares y de infección intramamaria en bovinos.”

Autora: M.V. Sofia Clara Sacco

Directora: Dra. Bibiana Dallard

Co-directora: Dra. María Sol Renna

-2019-

*“Y luego eso pasa...un día te despiertas y estas en ese lugar.
Estás en ese lugar donde todo se siente correcto.
Tú corazón está tranquilo. Tú alma esta encendida.
Tus pensamientos son positivos. Tú visión es clara.
Tú fe es más fuerte que nunca. Estás en paz.
En paz con donde has estado. En paz con lo que has atravesado.
Y en paz en paz con donde te diriges.”*

-The Minds Journal-

A las personas que amo ...

A mamá y papá...Helena y Eduardo

A mis hermanos...Manuel, Guillermo e Iván

A mis hermanas y hermano de la vida...Pame, Lali y Nico

A mis maestros...Pelú, Ana, Lluís y Paco

A los que llevaré siempre en el corazón...Pablo y Nico

Y a mi amor...Lucas

Agradecimientos

A Dios, por darme tanto que amar en esta vida.

A María Helena Hümöller y Eduardo Emilio Sacco, por darme la vida y hacerme lo que soy.

A Manuel Eduardo Sacco, Guillermo Valentín Sacco e Iván Pablo Sacco, por motivarme para superarme cada día.

A mis amigas y amigos, de Argentina, España, Italia, México, Chile y Colombia por su amor.

Y a mi amor Lucas Gauchat, por su cariño, contención y por hacerme feliz.

A Stella Maris Galván y Ana María Canal, y mi familia de la FCV, por darme una vocación.

A Lluís Luján y mi familia de la UNIZAR, por llenarme de pasión por mi profesión.

A Paco Uzal y la gente de CAHFS, por apoyarme mis sueños.

A mis directores Bibiana Dallard, María Sol Renna y Luís Calvino, y a todos los integrantes del ICiVet Litoral, por contribuir a mi formación.

Índice de contenidos

1 Introducción	1
1.1 Mastitis bovina.	2
1.2 Importancia económica y prevalencia de la enfermedad.....	2
1.3 Mastitis por <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.4 Características del patógeno: <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.5 Patogenia de la mastitis causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.6 Principales FV de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.6.1 Polisacaridos capsulares.	9
1.6.2 <i>Biofilm</i>	10
1.6.3 Genes de resistencia a los antibióticos.	13
1.7 Persistencia de las infecciones intramamarias por <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.8 Mecanismos de defensa de la GM bovina.	16
1.8.1 Inmunidad innata.	17
1.8.2 Inmunidad adaptativa.	24
2 Objetivos e hipótesis	29
2.1 Objetivo general	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
2.3 Hipótesis.....	30
3 Materiales y Métodos	31
3.1 Selección de cepas de <i>S. aureus</i>	32
3.1.1 Cultivo en medio sólido.....	34
3.1.2 Cultivo líquido para posterior extracción de ADN.....	34
3.1.3 Cultivo líquido para medir producción de <i>biofilm</i>	35
3.1.4 Cultivo líquido de 2 hs para ensayos de internalización.	35
3.1.5 Extracción de ADN genómico.....	35
3.1.6 Amplificación de una secuencia nucleotídica específica de <i>S. aureus</i>	36
3.1.7 Evaluación de la presencia de genes de virulencia por PCR de punto final.....	38
3.1.8 Tipificación molecular por electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE).	42
3.1.9 Genotipificación de ADN basado en microarreglos (<i>Microarray-based DNA genotyping</i>).	44
3.1.10 Cuantificación de la producción de <i>biofilm</i> mediante el método de cultivo en placa.	44
3.1.11 Curvas de crecimiento de cepas de <i>S. aureus</i>	46
3.1.12 Determinación de número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro.	46
3.1.13 Recuento de UFC/ml en diferentes tiempos del crecimiento bacteriano.....	47
3.1.14 Cultivo de células MAC-T.	47
3.1.15 Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de <i>S. aureus</i> en fase de crecimiento logarítmica y estacionaria en células MAC-T.	48

3.1.16 Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de <i>S. aureus</i> en células MAC-T.	50
3.1.17 Evaluación de la capacidad de adherencia de cepas de <i>S. aureus</i> en células MAC-T.	50
3.1.18 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> de persistir en células MAC-T.	51
3.1.19 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> para inducir muerte en células MAC-T.	52
3.1.20 Evaluación de la viabilidad de células MAC-T luego del co-cultivo con cepas de <i>S. aureus</i>	53
3.1.21 Evaluación de la viabilidad intracelular de cepas de <i>S. aureus</i> en células MAC-T.	54
3.2 Ensayo de fagocitosis, persistencia y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en macrófagos infectados con cepas de <i>S. aureus</i> marcadas con FITC.	55
3.2.1 Toma de muestras de secreción mamaria.	55
3.2.2 Marcación de las cepas de <i>S. aureus</i> con FITC.	56
3.2.3 Purificación de macrófagos de secreción mamaria de vaca seca.	56
3.2.4 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> de inducir actividad fagocítica y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos.	57
3.2.5 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> de inducir la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos.	58
3.2.6 Evaluación de la persistencia intracelular de cepas de <i>S. aureus</i> en macrófagos.	58
3.2.7 Evaluación de la viabilidad intracelular de cepas de <i>S. aureus</i> en macrófagos.	60
3.3 Puesta a punto del modelo de infección experimental en la glándula mamaria bovina.	60
3.3.1 Preparación del inóculo para la infección intramamaria con las cepas T y P de <i>S. aureus</i>	60
3.3.2 Prueba de la infección intramamaria experimental.	61
3.3.3 Inoculación intramamaria	61
3.3.4 Monitoreo de la evolución de la infección	62
3.4 Infección experimental de la glándula mamaria bovina con cepas T y P de <i>S. aureus</i>	62
3.4.1 Preparación del inóculo para la infección intramamaria.	62
3.4.2 Selección de los animales	62
3.4.3 Desafío experimental: infección intramamaria con cepas T y P de <i>S. aureus</i>	63
3.4.4 Monitoreo de la infección intramamaria y toma de muestras de leche y sangre... ..	63
3.4.5 Evaluación de la respuesta inmune en leche.	65
3.4.6 Evaluación de dinámica de las poblaciones celulares en sangre.	67
3.4.7 Evaluación de la respuesta inmune en sangre periférica.	67
3.4.8 Análisis estadístico de datos	69
4 Resultados	70
4.1. Selección de cepas de <i>S. aureus</i>	71

4.2. Evaluación de la presencia de genes de virulencia.....	71
4.3. Evaluación de la diversidad genética por PFGE.	73
4.4. Evaluación de la diversidad genética por genotipificación de ADN.....	74
4.5. Evaluación de la capacidad de producir <i>biofilm</i>	74
4.6. Evaluación de la capacidad de crecimiento <i>in vitro</i>	75
4.7. Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de <i>S. aureus</i> en fase de crecimiento logarítmica y estacionaria en células MAC-T.	77
4.8. Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de <i>S. aureus</i> en células MAC-T.	78
4.9. Evaluación de la capacidad de adherencia de cepas de <i>S. aureus</i> en células MAC-T.	79
4.10. Evaluación de la capacidad de persistencia de cepas de <i>S. aureus</i> en células MAC-T.	80
4.11. Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> para inducir muerte en células MAC-T.	81
4.12. Evaluación de la viabilidad de las células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas de <i>S. aureus</i>	83
4.13. Evaluación de la viabilidad de las cepas de <i>S. aureus</i> en el interior de las células MAC-T.	84
4.14. Evaluación de la capacidad de las cepas T y P de <i>S. aureus</i> de inducir actividad fagocítica y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos.	90
4.15. Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> de inducir la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos.....	93
4.16. Evaluación de la persistencia intracelular de las cepas de <i>S. aureus</i> en macrófagos.	94
4.16.1. Evaluación de la viabilidad intracelular de cepas de <i>S. aureus</i> en macrófagos..	95
4.17. Puesta a punto de la infección experimental en la glándula mamaria bovina.	97
4.18. Resultados preliminares de la infección experimental de la glándula mamaria bovina con cepas T y P de <i>S. aureus</i>	98
4.18.1. Monitoreo de la infección intramamaria.	98
4.18.1.1. Recuentos de células somáticas.....	99
4.18.1.2. Aislamiento microbiológico a partir de leche.....	100
4.18.2. Evaluación de la respuesta inmune en leche.	102
4.18.2.1. Evaluación de la producción de ON.	102
4.18.2.2. Cuantificación de los niveles de citoquinas en muestras de leche.	103
4.18.2.2.1. IL-1 β	103

4.18.2.2.2. IL-6.	105
4.18.2.2.3. IL-4.	106
4.18.2.3. Evaluación de los niveles de IgG total en muestras de leche.	107
4.18.3. Evaluación de dinámica de las poblaciones celulares en sangre.	109
4.18.3.1. Evaluación de la población de monocitos en sangre periférica.	110
4.18.3.2. Evaluación de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica.	111
4.18.3.3. Evaluación de la población de linfocitos B en sangre periférica.	112
4.18.3.4. Evaluación de la población de linfocitos T CD8 en sangre periférica.	113
4.18.3.5. Evaluación de la población de linfocitos T CD4 en sangre periférica.	114
5 Discusión	116
5.1 Caracterización molecular genotípica y fenotípica.	117
5.1.1 Evaluación de la diversidad genética por PFGE y genotipificación de ADN.	123
5.1.2 Curvas de crecimiento.	125
5.2 Evaluación de la adherencia e internalización de cepas de <i>S. aureus</i> en MAC-T.	126
5.3 Evaluación de la capacidad de cepas de <i>S. aureus</i> de persistencia y de inducción de muerte en células MAC-T.	128
5.4 Evaluación de la viabilidad de células MAC-T luego del co-cultivo con cepas de <i>S. aureus</i>	130
5.5 Ensayos de fagocitosis, persistencia y respuesta inflamatoria de macrófagos infectados con <i>S. aureus</i>	131
5.6 Puesta a punto de la infección experimental en la glándula mamaria bovina.	135
5.7 Infección experimental con cepas T y P de <i>S. aureus</i> : respuesta inmune innata y adaptativa.	136
5.7.1 Monitoreo de la IIM.	136
5.7.2 Recuentos de células somáticas y aislamiento microbiológico.	138
5.7.3 Producción de ON.	140
5.7.4 Cuantificación de los niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-4 en muestras de leche.	141
5.7.5 Evaluación de los niveles de IgG total en muestras de leche.	145
5.7.6 Evaluación de dinámica de las poblaciones de monocitos y de linfocitos T y B en sangre.	146
6 Conclusiones	151
7 Bibliografía	154
8 Anexos	185
8.1. Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones.	186
8.1.1. Microbiología.	186
8.1.2. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE).	186
8.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	187

8.1.4. Cultivos celulares.	187
8.1.5. ELISA.	188
8.2. Anexo 2: Tablas.	190

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de los mecanismos de defensa innatos de la glándula mamaria bovina	19
Tabla 2. Resumen de los mecanismos de defensa adaptativa de la glándula mamaria bovina	25
Tabla 3. Diferenciación y funciones de las diferentes subclases de linfocitos T	26
Tabla 4. Nombre, secuencia y características del par de oligonucleótidos utilizados en la identificación molecular de <i>S. aureus</i>	37
Tabla 5. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación y sus concentraciones finales.	37
Tabla 6. Etapas del programa de amplificación utilizado.....	37
Tabla 7. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para los genes <i>cap5</i> y <i>cap8</i> y concentración final.	38
Tabla 8. Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes <i>cap5</i> y <i>cap8</i> ..	39
Tabla 9. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para los genes <i>agrI</i> , <i>agrII</i> , <i>agrIII</i> y <i>agrIV</i> y concentración final.....	39
Tabla 10. Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes <i>agrI</i> , <i>agrII</i> , <i>agrIII</i> y <i>agrIV</i>	39
Tabla 11. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para los genes <i>icaA</i> , <i>icaC</i> e <i>icaD</i> y concentración final.....	40
Tabla 12. Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes <i>icaA</i> , <i>icaC</i> e <i>icaD</i>	40
Tabla 13. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para el gen <i>blaZ</i> y concentración final.	40
Tabla 14. Etapas del programa de amplificación utilizado para el gen <i>blaZ</i>	41
Tabla 15. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para el gen <i>bap</i> y concentración final.	41
Tabla 16. Etapas del programa de amplificación utilizado para el gen <i>bap</i>	41
Tabla 17. Clasificación de la capacidad para formar <i>biofilm</i> según método de cultivo en placa.....	45
Tabla 18. Anticuerpos utilizados en cinética de las diferentes poblaciones en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T), 5011 (P) y controles.	68
Tabla 19. Análisis de la presencia o ausencia de genes que codifican para polisacáridos capsulares (<i>cap5</i> y <i>cap8</i>), formación de <i>biofilm</i> (<i>agr</i> , <i>ica</i> y <i>bap</i>), y del gen de resistencia a los β -lactámicos (<i>blaZ</i>) en aislados de <i>S. aureus</i> procedentes de IIM T y P.	72
Tabla 20. Resumen de la genotipificación de las cepas de <i>S. aureus</i> y agrupación en complejos clonales.....	74
Tabla 21. Tiempos de duración de la fase de crecimiento logarítmica y velocidad de crecimiento de las diferentes cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas.	77
Tabla 22. Aislamiento microbiológico a partir de leche de cuartos mamarios desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> a diferentes tiempos post-inoculación.	102

Índice de figuras

Figura 1. A. Colonias de <i>S. aureus</i> crecidas en agar base con morfología característica: redondeadas, blancas, crema o amarillentas.....	6
Figura 2. Ciclo de vida del <i>biofilm</i>	11
Figura 3. A. Esquema que muestra las defensas anatómicas y celulares de la GM.	21
Figura 4. Siembra en estrías de <i>S. aureus</i> en CAB.....	34
Figura 5. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en cultivo líquido CTS.....	35
Figura 6. A. MAC-T en confluencia con morfología normal pre-infección. B. MAC-T infectadas con <i>S. aureus</i> . Se observa un puntillado negro correspondiente a las bacterias sobre las MAC-T en confluencia.....	49
Figura 7. A. Muestras para cultivo microbiológico. B. Muestras de secreción mamaria para aislamiento y purificación de macrófagos.	56
Figura 8. Cronograma de toma de muestras de leche y sangre pre-inoculación (pre-i) y post-inoculación (post-i).....	64
Figura 9. PFGE. Patrones de bandas obtenidos a partir de cada cepa de <i>S. aureus</i>	73
Figura 10. Representación de las densidades ópticas obtenidas luego del cultivo en placas de poliestireno de los aislados de <i>S. aureus</i> provenientes de IIM transitorias y persistentes.	75
Figura 11. Curvas de crecimiento para las distintas cepas de <i>S. aureus</i> durante 24 hs. 76	
Figura 12. Número de UFC/ml recuperadas de células MAC-T luego de la infección con las cepas de <i>S. aureus</i> 179 (T) y 5011 (P) crecidas en fase de crecimiento logarítmico (2 hs) y estacionaria (16 hs).....	78
Figura 13. Número de UFC/ml recuperadas de las células MAC-T luego de la infección con diferentes cepas de <i>S. aureus</i>	79
Figura 14. Número de UFC/ml adheridas a las células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas de <i>S. aureus</i> 806 (T) y 5011 (P). Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes.....	80
Figura 15. Número de UFC/ml recuperadas del interior de las células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas de <i>S. aureus</i> 806 (T) y 5011 (P).	81
Figura 16. Determinación de la muerte de células MAC-T mediante citometría de flujo.	82
Figura 17. Porcentaje de apoptosis en células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> . Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes.....	83
Figura 18. Evaluación de la viabilidad de células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> mediante ensayos de reducción del XTT. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes.	84
Figura 19. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 4 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (400x).....	85
Figura 20. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 4 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000X).....	86
Figura 21. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 10 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000x).....	87

Figura 22. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 24 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000x).....	88
Figura 23. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 48 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000x).....	89
Figura 24. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 72 hs post-infección con la cepa 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000x). Las células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) no presentaron bacterias intracitoplasmáticas.	89
Figura 25. Estrategia de “gating” utilizada para el análisis de la fagocitosis y producción de ROS en la población de macrófagos totales y con al menos una bacteria asociada (adherida y/o internalizada).....	91
Figura 26. A. Porcentajes promedio de macrófagos FITC+ conteniendo al menos una bacteria asociada (adherida y/o internalizada) luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> marcados con FITC. B. Promedio de la IFM de macrófagos FITC + luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> marcadas con FITC.	92
Figura 27. A. Porcentajes promedio de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> marcadas con FITC. B. Promedio de la IFM de la producción de ROS en macrófagos luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> marcadas con FITC. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes.....	92
Figura 28. A. Porcentajes promedio de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la población de macrófagos FITC+, que estuvieron en contacto con al menos una bacteria, luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> . B. Promedio de la IFM para la producción de ROS intracelular en la población de macrófagos FITC+ luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> ..	93
Figura 29. Concentración de nitritos producidos por macrófagos de secreción mamaria luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i>	94
Figura 30. Microscopía de fluorescencia en macrófagos a las 2 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000x).....	95
Figura 31. Microscopía de fluorescencia en macrófagos a las 4 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> (1000x).....	96
Figura 32. Recuento de células somáticas (Log10) en los cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica desde la hora 0 (pre-i) hasta las 120 hs post-i.....	98
Figura 33. Recuento de células somáticas (Log10) en los cuartos desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE).	100
Figura 34. Concentración de nitritos en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación.....	103
Figura 35. Concentración de IL-1 β (pg/mL) en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE).	104

Figura 36. Concentración de IL-6 (pg/mL) en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). 105	105
Figura 37. Concentración de IL-4 (pg/mL) en muestras de leche de cuartos de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). 106	106
Figura 38. Niveles de IgG total en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y de controles inoculados con solución fisiológica. Placa sensibilizada con lisado de la cepa 806 (T). 107	107
Figura 39. Niveles de IgG total en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica. Placa sensibilizada con lisado de la cepa 5011 (P). Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). 108	108
Figura 40. Estrategia de “gating” utilizada para el análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica..... 110	110
Figura 41. Porcentaje de monocitos en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. 111	111
Figura 42. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. 112	112
Figura 43. Porcentaje de linfocitos B en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. 113	113
Figura 44. Porcentaje de linfocitos T CD8 en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. 114	114
Figura 45. Porcentaje de linfocitos T CD4 en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de <i>S. aureus</i> y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. 115	115

Abreviaturas

Aa	Aminoácidos
AD	Anterior derecho
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agr	Regulador de genes accesorio
AI	Anterior izquierdo
AIP	Péptido autoinducido
AMS	Agar Manitol Salado
APC	Allophycocyanin
Bap	Proteína asociada a <i>biofilm</i>
CAB	Columbia agar base
CC	Complejo clonal
CD	Células dendríticas
Cél	Células
CEM	Células epiteliales mamarias
Cif	Proteína de unión a fibrinógeno
Cna	Proteína de unión a colágeno
eNOS	Óxido nítrico sintasas constitutiva
CP	Polisacárido capsular
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Células presentadoras de antígeno
CTL	Células T citotóxicas
CTS	Caldo Tripteína Soya
DO	Densidad óptica
DOc	Densidad óptica de corte
DS	Desvío estándar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EbpS	Proteína de unión a elastina
EEA Rafaela	Estación Experimental Agropecuaria Rafaela
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Eno	Proteína de unión a laminina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

FnBPs	Proteínas de superficie de unión a fibronectina
FV	Factores de virulencia
GM	Glándula mamaria
ica	Cluster de adhesión intercelular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
Ii	Inóculo inicial
IIM	Infección intramamaria
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasas inducible
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IP	Ioduro de propidio
Lagtime	Duración de la fase de crecimiento logarítmica
LBCMA	Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MAC-T	Células epiteliales mamarias bovinas transformadas
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microbios
MEC	Matriz extracelular
MOI	Multiplicidad de infección
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a la meticilina
MSCRAMM	Componentes de superficie microbiana de reconocimiento de moléculas de matriz adhesiva
MSLT	Tipificación de secuencia multilocus
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
NK	Células <i>natural killer</i> o asesinas naturales
NOS	Óxido nítrico sintasa
NP	No persistente
NT	No tipificable
ON	Nitric oxide u óxido nítrico
P	Persistente
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Posterior derecho
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PGN	Peptidoglucanos
PI	Posterior izquierdo
pi	Post-infección
PIA	Polisacárido de adhesión intercelular
PMN	Polimorfonucleares
PNAG	Poli- β -(1,6)-N-acetilglucosamina
PT	Pulsotipo
post-i	Post-inoculación
pre-i	Pre-inoculación
PS	Fosfatidilserina
RCS	Recuentos de células somáticas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE	Ficoeritrina
rpm	Revoluciones por minuto
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a la meticilina
SCCmec	<i>Staphylococcus</i> Chromosome Cassette mec
SCN	<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos
SCV	Small colony variants
<i>SigB</i>	Factor alternativo sigma B
SN	Sobrenadante
ST	Secuencia-Tipo
T	Transitoria
TCR	Receptor de células T
Th	Células T cooperadoras
Ti	Tiempo
TLR	Receptores toll-like
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tregs	Células T reguladoras
UFC	Unidades formadoras de colonia

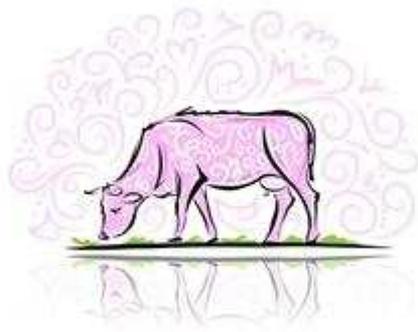
Resumen

El objetivo general de este trabajo fue estudiar diferentes aspectos de la compleja interacción entre genotipos bacterianos definidos y caracterizados como de alta y baja adaptación a la glándula mamaria (GM) con el hospedador, para poder comprender en parte, el establecimiento y cronicidad de las infecciones intramamarias (IIM) causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. Se seleccionó la cepa 806 transitoria (T), *cap8*, *icaACD*, *agrII*, fuerte productora de *biofilm*, pulsotipo D, ST350 y poco invasiva en células epiteliales mamarias (MAC-T); y la cepa 5011 persistente (P), *cap5*, *icaACD*, *agrI*, *blaZ*, débil productora de *biofilm*, pulsotipo O, CC188 y altamente invasiva. La cepa P presentó mayor sobrevivencia intracelular en MAC-T y macrófagos. MAC-T infectadas con ambas cepas murieron por apoptosis, induciendo la cepa P mayores porcentajes de muerte. Los macrófagos infectados con la cepa P mostraron mayor capacidad fagocítica. La producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico (ON) fue similar para ambas cepas. Los resultados de la IIM experimental difirieron entre ambas cepas, la T indujo aumento del recuento de células somáticas (RCS), ON, IL-1 β , IL-6 e IgG total en leche a las 48 hs post-infección (pi); en sangre, indujo una disminución de los monocitos, linfocitos T $\gamma\delta$ y CD8. La cepa P, indujo un aumento del RCS a los 7 días pi y del ON 14 días pi. La combinación de factores de virulencia de *S. aureus* podría determinar el inicio de la interacción patógeno-hospedador e influenciar la respuesta inmune de la GM y la evolución del proceso infeccioso.

Abstract

The general objective of this study was to investigate the interaction between *Staphylococcus aureus* with different genotypes adaptation (low and high) to de bovine mammary gland (MG) and to de host immune response in order to understand intramammary establishment and chronicity. Two strains of *S. aureus* were isolated from transient (T) and persistent (P) intramammary infections (IMI). The first was *S. aureus* 806 (strain *cap8*, *icaACD*, *agrII*, strong biofilm producer, D pulsotype, ST350 and low invasion ability in bovine mammary epithelial cells-MAC-T). The second one was *S. aureus* 5011 (strain *cap5*, *icaACD*, *agrI*, *blaZ*, weak biofilm producer, O pulsotype, CC188 and high invasion ability). Strain P showed higher survival capacity in MAC-T and macrophages than strain T. MAC-T infected with both strains died by apoptosis. P strain produced higher apoptosis percentage than T strain. The macrophages infected by strain P showed a higher percentage of phagocytosis than those infected by strain T. Macrophages infected with both strains showed similar production of reactive oxygen species and nitric oxide (NO). Bovine experimental IMI showed that T strain produced an increase in somatic cell count (SCC), ON, IL-1 β , IL-6 and IgG in milk 48 h post-infection (pi) and a decrease of CD14 monocytes, T $\gamma\delta$ and CD8 lymphocytes. P strain produced an increase in SCC 7 days pi and in ON 14 days pi. The MG immune response, the evolution of the process as well as the pathogen-host interaction could be determined by the combination of bacterial virulence factors.

1 Introducción



1.1 Mastitis bovina.

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria (GM) y es principalmente causada por infecciones bacterianas. Esta enfermedad es la más frecuente de las vacas lecheras y tiene efectos perjudiciales sobre el bienestar animal y la rentabilidad del establecimiento lechero (Hogeveen y col., 2011). La mastitis es una enfermedad compleja y multifactorial, que resulta de la interacción entre la vaca, el ambiente, incluida la máquina de ordeño, y los microorganismos (Hawari y Al-Dabbas, 2008).

En función de la duración del proceso inflamatorio, la mastitis se clasifica como hiperaguda, aguda o crónica y en función de la severidad del proceso inflamatorio, como clínica (con signos de inflamación evidentes en la GM y alteraciones visibles en la leche) o subclínica (sin signos macroscópicos de inflamación en la GM ni alteraciones visibles en leche). Las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunos gérmenes Gram negativos, son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos (Ruegg, 2017).

Dependiendo de su reservorio primario y modo de transmisión, la mastitis puede clasificarse como "contagiosa" o "ambiental". Los patógenos contagiosos viven y se multiplican en la GM y la piel del pezón, se transmiten de animal a animal principalmente durante el ordeño e incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y a especies de *Mycoplasma* (Fox y Gay, 1993). Los patógenos ambientales son aquellos cuyo reservorio primario es el ambiente donde viven los animales. Estos organismos constituyen un grupo heterogéneo, siendo los más frecuentemente aislados *Streptococcus uberis* y las bacterias coliformes (*Escherichia coli* y *Klebsiella*), mientras que *Streptococcus dysgalactiae* comparte características de los patógenos ambientales y los contagiosos (Bogni y col., 2011).

Un tercer grupo de organismos lo conforman los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), que, si bien son considerados como integrantes de la flora normal de la piel de la ubre y los pezones, también pueden causar infecciones del canal del pezón y de la GM.

1.2 Importancia económica y prevalencia de la enfermedad.

A pesar de la considerable investigación en mastitis en rumiantes lecheros, la enfermedad sigue siendo un problema importante para la industria láctea. La necesidad de controlar la mastitis se debe a múltiples consideraciones, incluida la calidad de la leche,

la rentabilidad económica del productor, la reducción del uso de antimicrobianos y el bienestar de los animales. Además, los consumidores exigen productos lácteos saludables, nutritivos, seguros y que se originen de animales sanos (Rainard y col., 2017).

Las consecuencias económicas de la mastitis (clínica o subclínica) se deben a los costos de tratamiento, las pérdidas de producción, el sacrificio de animales, los cambios en la calidad del producto y el riesgo de otras enfermedades (Halasa y col., 2007). Tanto en las mastitis clínicas como en las subclínicas, las pérdidas en la producción láctea son substanciales. La disminución de la producción de leche representa aproximadamente el 70% del costo total de la mastitis (Huijps y col., 2008). El daño tisular mamario reduce el número y la actividad de las células epiteliales y, en consecuencia, contribuye a la disminución de la producción de leche (Zhao y Lacasse, 2008). Además, la llegada de polimorfonucleares (PMN) neutrófilos a la GM y el daño epitelial conducen a un marcado aumento en los recuentos de células somáticas (RCS) y por lo tanto, a una disminución de la calidad y el valor nutricional y comercial de la leche. A medida que la infección persiste, el número de células somáticas en la leche continúa aumentando y, en forma concomitante, se incrementa el daño tisular.

Por otra parte, la causa más común para un descarte prematuro de las vacas lecheras son los problemas de salud de la GM, además de problemas de fertilidad. El 26,5 % de los descartes de vacas lecheras en el continente americano se debe a trastornos ocasionados por la mastitis (Wolter y col., 2004).

Además del impacto económico de la mastitis producido por disminución de la producción láctea, existen gastos directos asociados a su control. Entre ellos, cabe destacar el costo del diagnóstico, tratamiento y los honorarios de los servicios veterinarios. De esta manera, el impacto económico total asociado a la mastitis surge de sumar los beneficios no obtenidos a los gastos adicionales. Se calcula que en los Estados Unidos las pérdidas económicas producto de las mastitis clínicas oscilan entre US\$ 95 a US\$ 211 (Cha y col., 2011), en Finlandia entre € 112 a € 946 (Heikkilä y col., 2012) y en Canadá \$ 744 por vaca por año (Jamali y col., 2018).

En Argentina no se dispone de estadísticas globales actualizadas acerca de las pérdidas económicas causadas por la mastitis y los datos disponibles son parciales ya que no incluyen a las principales cuencas lecheras del país. Vissio y col. (2015), estimaron los costos diarios directos de la mastitis y las erogaciones derivadas de su control y prevención en la cuenca de Villa María, Córdoba. El costo total diario, representado por

la sumatoria de las pérdidas productivas por mastitis subclínica (elevado RCS), mastitis clínica y gastos de control, representó el 16% de los ingresos brutos diarios del productor.

En nuestro país se observó un importante avance en el control de la mastitis en los últimos 15 años; fundamentalmente debido a la implementación de protocolos de buenas prácticas en el tambo. Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad en Argentina sigue siendo elevada. En un estudio que incluyó muestras de 20.117 vacas en lactancia pertenecientes a 112 tambos ubicados en las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires relevados entre mayo de 1999 y agosto de 2007 por presentar problemas de mastitis, mostró que los patógenos aislados con mayor frecuencia fueron *S. aureus* con el 57%, *S. agalactiae* 29%; mientras que los miembros del grupo de *Streptococcus* no-agalactiae fueron hallados en el 12% de los animales. *Staphylococcus aureus* fue aislado casi en la totalidad de los rodeos analizados (>97%) (Signorini y col., 2008). En un estudio más reciente, que incluyó un relevamiento aleatorizado realizado sobre 2.296 vacas pertenecientes a 51 rodeos lecheros de la Provincia de Córdoba, 54% mostraron mastitis subclínica evidenciada por recuentos de células somáticas $\geq 200,000/\text{ml}$. A partir de estas muestras, los organismos patógenos más frecuentemente aislados fueron SCN 52.1%, seguidos por *S. aureus* 21.3%, *Corynebacterium spp.* 5.2%, *S. agalactiae* (4.4%) y *S. dysgalactiae* (4.4%) (Dieser y col., 2014).

1.3 Mastitis por *Staphylococcus aureus*.

Las cepas patógenas de estafilococos son siempre de origen humano o animal y persisten como habitantes de la piel y membranas mucosas, aunque también se pueden aislar del medio ambiente de las vacas lecheras (Roberson y col., 1994; Capurro y col., 2010). La mastitis es la principal enfermedad causada por *S. aureus* en rumiantes, incluidas las vacas, ovejas, cabras, camellos y búfalos de agua (Anderson, 1982). Las GM infectadas y la colonización extramamaria en animales lecheros son los principales reservorios de *S. aureus*, por lo cual la principal forma de transmisión de este patógeno entre vacas ocurre durante el ordeño (Zecconi y col., 2006). La ruta más común de invasión es a través del orificio y canal del pezón. *Staphylococcus aureus* coloniza el extremo del pezón y/o lesiones del mismo. La diseminación de la infección puede ocurrir a través de las manos del ordeñador, toallas húmedas, las pezoneras, y las moscas. Durante el ordeño, fluctuaciones irregulares de vacío pueden forzar a la bacteria dentro del canal del pezón, provocando una potencial nueva infección (Rainard y col., 2017).

El proceso infeccioso puede variar de transitorio (T) a persistente (P) (Jubb y col., 2016); y la mastitis estafilocócica puede ser subclínica o clínica; de leve a severa o fulminante; e hiperaguda, aguda o crónica (Zachary, 2016). La forma fulminante de la enfermedad ocurre generalmente poco después del parto, y presenta gangrena de las mamas afectadas y alta mortalidad (Jubb y col., 2016). Por otra parte, aunque las cepas de *S. aureus* pueden causar mastitis supurativa aguda y clínica, tales infecciones bacterianas pueden evolucionar hacia la mastitis crónica subclínica con fibrosis y presentar ocasionalmente episodios de reagudización de la signología de la enfermedad. En el caso de mastitis clínica leve o moderada, los cambios en la GM pueden incluir hinchazón, calor, dolor y enrojecimiento. Se denomina grave si la respuesta incluye afectación sistémica como fiebre, anorexia y shock (Zhao y Lacasse, 2008; Ballou, 2012).

En las vacas lecheras, la mastitis por *S. aureus* es comúnmente subclínica y se manifiesta por elevadas concentraciones de leucocitos (principalmente neutrófilos) en la leche (elevados RCS) y persistencia de las bacterias en la GM (Rainard y col., 2017). La mastitis subclínica estafilocócica representa el 30% de los casos de mastitis bovina (Halasa y col., 2007). Los casos subclínicos tienen especial importancia ya que pasan desapercibidos para el productor y afectan en gran medida el rendimiento de la producción de los animales. Aunque la mayoría de los casos de mastitis por *S. aureus* son subclínicos, las vacas crónicas suelen presentar elevados RCS, tejido mamario anormal y casos recurrentes de mastitis clínica (Suleiman y col., 2012).

1.4 Características del patógeno: *Staphylococcus aureus*.

Los estafilococos, son cocos Gram positivos que tienen 0,5-1,5 μm de diámetro y en los exudados, forman grupos, pares o cadenas cortas. Estos cocos a pesar de no ser esporulados, son extremadamente resistentes y se mantienen viables durante mucho tiempo en ambientes húmedos y en objetos inanimados. Las colonias son redondas y relativamente grandes (3-5 mm) y son pigmentadas, de color blanquecino o amarillento (Figura 1A). *Staphylococcus aureus* contiene la enzima coagulasa que convierte el fibrinógeno del plasma en fibrina y es un factor de virulencia de estos organismos que se correlaciona con la patogenicidad. A diferencia de los SCN, la mayoría de las cepas de *S. aureus* son toxigénicas. Esta capacidad es evidente por la producción de toxinas hemolíticas cuando se las siembra en agar sangre (Figura 1B). Las toxinas detectables en agar sangre incluyen las toxinas α , β y δ , cada una de las cuales exhibe propiedades únicas.

La toxina α es una toxina formadora de poros que causa la lisis completa de los eritrocitos. En contraste, la toxina β es una esfingomielinasa que presenta una gran actividad contra eritrocitos de oveja y genera una forma incompleta de hemolisis conocida como hemolisis turbia. Por otra parte, la toxina δ es una modulina soluble en fenol estrechamente asociada con el sistema regulador agr (regulador de genes accesorio) (McVey y col., 2013; Quinn y col., 2015).

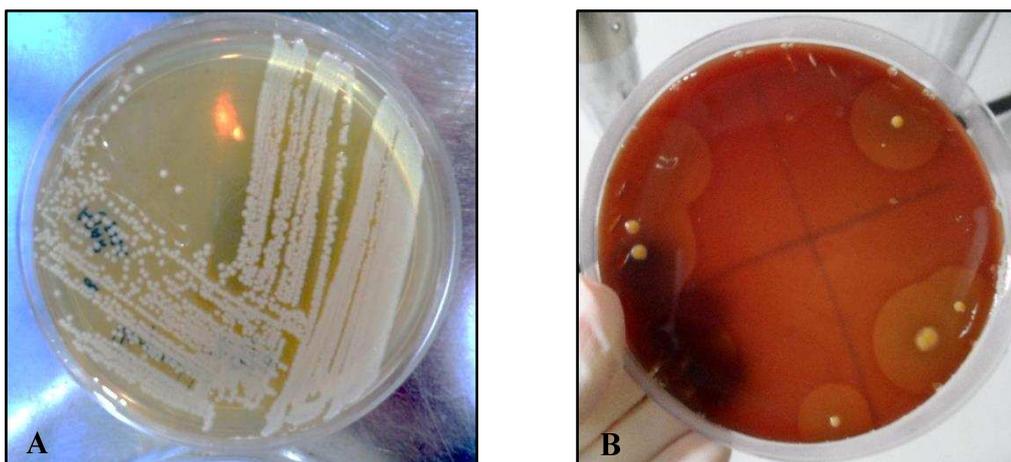


Figura 1. A. Colonias de *S. aureus* crecidas en agar base con morfología característica: redondeadas, blancas, crema o amarillentas. Cultivo de 24 hs, atmósfera aerobia, 37 °C. **B.** $\alpha\beta$ hemolisis de *S. aureus* crecido en agar suplementado con 5% de sangre bovina. Cultivo de 24 hs, atmósfera aerobia, 37 °C.

Si bien *S. aureus* se ha considerado ampliamente como una bacteria extracelular, también se ha demostrado que puede comportarse como intracelular, ya que posee la habilidad de invadir y sobrevivir dentro de diferentes tipos celulares, incluyendo células epiteliales mamarias (CEM), neutrófilos y macrófagos (Almeida y col., 1996; Hebert y col., 2000; Sinha y Fraunholz, 2010), protegiéndose de la respuesta inmune humoral del hospedador y del efecto de los tratamientos con antibióticos. Además, trabajos previos han demostrado que las infecciones persistentes o difíciles de remitir pueden relacionarse con la capacidad de este patógeno para formar una población de crecimiento lento denominada variantes de colonias pequeñas (*small colony variants*, SCV) que pueden sobrevivir dentro de las células fagocíticas profesionales y no profesionales y posteriormente modular las respuestas inmunes (Atalla y col., 2008; Sinha y Fraunholz, 2010; Tuchscher y col., 2010a). Las IIM por *S. aureus* usualmente no responden al tratamiento antimicrobiano y se vuelven crónicas (Sol y col., 2000). Estas particulares

características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas terapéuticas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008).

Estudios previos han demostrado que genotipos definidos de *S. aureus* que expresan determinados factores de virulencia (FV) se han asociado con las manifestaciones clínicas y el comportamiento epidemiológico de las IIM causadas por este organismo; estas características podrían influir también en la persistencia del patógeno en la GM (Haveri y col., 2007; 2008; Fournier y col., 2008; Piccinini y col., 2010; 2012; Budd y col., 2016).

1.5 Patogenia de la mastitis causada por *Staphylococcus aureus*.

La patogénesis de la mastitis causada por *S. aureus* es compleja y aun no se ha esclarecido completamente (Rainard y col., 2017). La infección de la GM ocurre generalmente por vía ascendente. Los microorganismos colonizan el canal del pezón, alcanzan la cisterna del mismo y de la glándula, y de allí pueden llegar a colonizar los alvéolos mamarios y establecerse en un área de tejido secretor, desencadenando una respuesta inflamatoria. Los sistemas de defensa inmune innato y adaptativo son responsables de intentar controlar la entrada, proliferación e invasión tisular y para ello involucran un amplio espectro de respuesta que incluye reacciones tisulares, celulares y la producción de un gran número de citoquinas (Pereyra y col. 2014; Rainard y col., 2017).

El desarrollo de la IIM y la respuesta de los tejidos a la presencia de *S. aureus* dependen no solo de la efectividad de los mecanismos de defensa del hospedador sino también del índice de multiplicación del microorganismo y el tipo y concentración de los FV. *Staphylococcus aureus* se caracteriza por la presencia de múltiples FV, algunos de los cuales estarían relacionados con la severidad de las IIM que se desarrollan en el hospedador (Fournier y col., 2008).

Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* se adhiere a la CEM y a componentes de la matriz extracelular y posteriormente la invade. La adhesión es un requisito previo y un paso temprano crucial para la infección de la GM. *Staphylococcus aureus* puede escapar del interior del endosoma al citoplasma de la CEM e inducir la apoptosis (Bayles y col., 1998). Durante las IIM por *S. aureus*, la inducción de apoptosis por este patógeno puede generar daño en el tejido mamario, comprometer la respuesta inmune protectora y de este modo facilitar la propagación del microorganismo (Genestier y col., 2005; Zhao y Lacasse, 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* induce apoptosis en

neutrófilos (Sladek y col., 2005; Genestier y col., 2005), linfocitos (Slama y col., 2009), macrófagos (Krzyminska y col., 2012) y CEM bovinas (Bayles y col., 1998; Hu y col., 2014).

Para poder adherirse a la célula hospedadora, *S. aureus* expresa varias adhesinas de superficie que reconocen moléculas de adhesión de la matriz denominados componentes de superficie microbiana de reconocimiento de moléculas de adhesión de la matriz (MSCRAMM, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Foster y col., 1998). Entre las MSCRAMM de *S. aureus* más importantes se encuentran: proteínas de unión a fibronectina A y B (FnBP-A y FnBP-B), proteína de unión a colágeno (Cna), proteína de unión a laminina (Eno), proteína de unión a elastina (EbpS), proteína de unión a fibrinógeno (*Fib*) o factor de agregación (*clumping factor-Clf*) y proteína asociada a la producción de *biofilm* (Bap) (Seo y col., 2008; Abraham y Jefferson, 2010; Atshan y col., 2012).

Durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los FV asociados a la superficie bacteriana se expresan preferencialmente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase postlogarítmica. Se ha propuesto que esta expresión bifásica de los FV cumpliría con la función de organizar el proceso de infección. Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del hospedador facilitando la colonización, seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas (α , β , γ y δ hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (serina proteasas, cisteína proteasas, lipasas) (Lowy, 1998).

Durante el proceso de infección, las bacterias encuentran diferentes condiciones estresantes que deben superar para establecer y mantener una infección. En la infección aguda tienen que evadir la acción de las células inmunes y destruir las células del tejido para llegar hasta estructuras profundas. Por otra parte, en la fase crónica para evadir las maquinarias de degradación intracelular, las bacterias tienen que desarrollar diferentes estrategias, como la destrucción de las células huésped o el escape de los compartimentos lisosomales y la persistencia silenciosa dentro de la ubicación intracelular (Haslinger-Löffler, 2005; Tuchscherer y col., 2010a; Grosz y col., 2013).

1.6 Principales FV de *Staphylococcus aureus*.

La patogenia de la mastitis por *S. aureus* se atribuye al efecto combinado de factores extracelulares y toxinas, junto con las propiedades invasivas de las cepas tales como

adherencia, formación de *biofilm* y resistencia a la fagocitosis (Cramton y col., 1999). Entre las numerosas adhesinas presentes en la membrana de *S. aureus*, la habilidad de internalizarse en células epiteliales y fagocitos no profesionales (Almeida y col., 1996; Gresham y col., 2000; Sinha y Fraunholz, 2010) estaría relacionada principalmente con la expresión de proteínas superficiales de unión a fibronectina (FnBP) (Fowler y col., 2000), las cuales se encuentran presentes en la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones humanas y bovinas (Mongodin y col., 2002; Ote y col., 2011; Klein y col., 2012). Las proteínas FnBP-A y FnBP-B (codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*) se encuentran ancladas a la membrana de la pared celular de *S. aureus*. Resultados recientes de nuestro grupo de trabajo demostraron que cepas de *S. aureus* con alta capacidad de internalización a la CEM sobre expresaron *fnBP* en comparación con las cepas de baja capacidad invasiva (Pereyra y col., 2016) resaltando la importancia de este FV en la adhesión-invasión a las CEM.

1.6.1 Polisacaridos capsulares.

Staphylococcus aureus produce polisacáridos capsulares (CP) tanto *in vivo* como *in vitro* bajo condiciones definidas de cultivo (Stringfellow y col., 1991; Lee y col., 1993). Estos CP son importantes en la patogénesis de infecciones estafilocócicas y han sido postulados como uno de los principales FV de la bacteria (O'Riordan y Lee, 2004). Los serotipos de polisacáridos capsulares 5 y 8 (CP5 y CP8) son los de mayor prevalencia en bovinos, estando asociados al 70-80% de los aislamientos (Guidry y col., 1997; Tollersrud y col., 2000). La producción de CP por *S. aureus* enmascara los anticuerpos dirigidos contra componentes de la pared celular e impide el mecanismo de activación por complemento, por lo cual las cepas capsuladas son más resistentes a la fagocitosis (Paape y col., 2003). De este modo los CP dificultan la eliminación de la bacteria e incrementan su habilidad para diseminarse y sobrevivir en el torrente sanguíneo y tejidos (O'Riordan y Lee, 2004). Se ha demostrado que la ausencia de expresión de CP aumenta la adherencia (Pöhlmann-Dietze y col., 2000) e invasión de *S. aureus* a las células endoteliales y epiteliales mamarias bovinas *in vitro* (Buzzola y col., 2007; Thurlow y col., 2011; Bardiau y col., 2014). Además, se ha observado que cepas de *S. aureus* CP negativas indujeron mastitis experimentales crónicas en ratones, sugiriendo que la pérdida de la expresión de cápsula podría aumentar la persistencia de *S. aureus* en la GM (Tuchscher y col., 2005).

1.6.2 *Biofilm.*

Se ha documentado que la formación de *biofilm* es un importante FV de *S. aureus* que facilita la adherencia y colonización del epitelio de la GM y que constituye un medio por el cual las bacterias evaden las defensas inmunológicas del animal causando IIM persistentes en los bovinos (Cucarella y col., 2002; 2004; Melchior y col., 2006; 2007; Wu y col., 2011). Si bien la habilidad de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina para producir *biofilm in vitro* ha sido evaluada en diferentes estudios usando varios métodos (Dhanawade y col., 2010; Oliveira y col., 2006), la demostración de su formación *in vivo* continúa siendo un desafío (Veh y col., 2015). A la fecha no existen estudios *in vivo* que puedan respaldar directamente la hipótesis de que la formación de *biofilm* es responsable de la ineficacia de la terapia con antimicrobianos y de la persistencia de las IIM causadas por *S. aureus* en bovinos (Melchior y col., 2006; Veh y col., 2015; Schönborn y Krömker, 2016).

La formación de *biofilm* ocurre a través de pasos secuenciales, con una inicial adherencia de la bacteria planctónica a una superficie sólida, seguida de la subsecuente proliferación y acumulación de clusters celulares en múltiples capas, y la formación final de una comunidad bacteriana encerrada en una matriz polimérica producida por ella misma (Stoodley y col., 2002). Finalmente, en el proceso de maduración, muchos estafilococos generan un glicocalix, una capa de limo que protege aún más a las bacterias en el *biofilm* (Melchior y col., 2006). Cuando el *biofilm* llega a una masa crítica, se alcanza un equilibrio dinámico en el que la capa celular más externa comienza a generar organismos planctónicos. Estas bacterias son libres de escapar del *biofilm* y colonizar otras superficies (Dunne, 2002) (Figura 2). Estudios preliminares con cepas aisladas de mastitis en rumiantes han demostrado la capacidad de producir *biofilm in vivo* seguido a la infección experimental de la GM en ovejas. Además, las cepas productoras de *biofilm* tuvieron una capacidad de colonización significativamente más alta comparadas con las variantes no productoras (Baselga y col., 1993).

La formación de *biofilm* perjudica la acción tanto del sistema inmune del hospedador como de los agentes antimicrobianos, y por lo tanto representa uno de los mecanismos de supervivencia más importantes de bacterias que colonizan en forma persistente el nicho extracelular (Melchior y col., 2006). Sin embargo, la expresión de un fenotipo *biofilm* positivo en cepas de estafilococos puede depender de la presencia de glucosa, cloruro de

sodio (NaCl), así como de otras condiciones ambientales, y de determinados factores genéticos (Christensen y col., 1982; Bardiau y col., 2014).

La implicancia de los *biofilms* en las infecciones y en la resistencia a drogas ha incrementado el interés en la caracterización de los genes que están involucrados en la formación de los mismos. Numerosos son los genes de *S. aureus* que se han asociado a la producción de *biofilm*, algunos de los más relevantes son: los genes *ica* (*intercellular cluster adhesin*, en español, cluster de adhesión intercelular), el gen *bap* que codifica para la producción de la proteína de superficie Bap (*biofilm associated protein* o proteína asociada a *biofilm*) y el tipo Agr (*accessory gene regulator* o gen regulador accesorio).

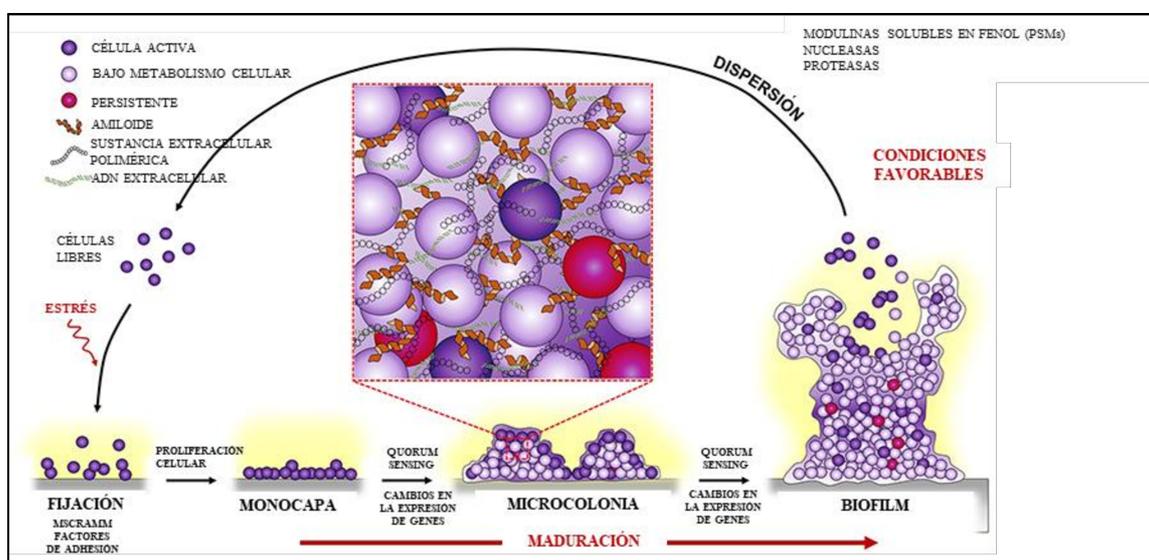


Figura 2. Ciclo de vida del *biofilm*. (Adaptado de Reffuveille y col., 2017).

1.6.2.1 Genes *ica*.

Trabajos previos han detectado la presencia del locus *ica* en la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina, indicando un rol potencial como factor de virulencia en la patogenia de la mastitis en rumiantes (Cucarella y col., 2004). El locus *ica* está compuesto por los genes *icaADBC* y entre ellos, *icaA* e *icaD* han mostrado un rol importante en la formación de *biofilm* en *S. aureus* y *S. epidermidis* (Götz, 2002). La matriz extracelular que encierra la comunidad bacteriana está conformada por el polisacárido de adhesión intercelular (PIA, *polysaccharide intercellular adhesin*) o poly-N-acetyl-β-1,6-glucosamina (PNAG), producido por las enzimas codificadas por el operón *icaADBC* (Cucarella y col., 2004; Götz, 2002). Los genes *icaA* e *icaD* cumplen

un rol primario en la síntesis del exopolisacárido. El gen *icaA* codifica la N-acetilglucosaminiltransferasa, enzima transmembrana involucrada en la síntesis del PNAG (Gerke y col., 1998). El gen *icaD* ha sido reportado como un gen crítico para la máxima expresión de la N-acetilglucosaminiltransferasa (Arciola y col., 2001). El producto de *icaC* está involucrado en la traslocación del exopolisacárido sintetizado a la superficie celular. El producto de *icaB* es la N-deacetilasa responsable por la parcial deacetilación del PNAG. La deacetilación del PNAG es relevante para el desarrollo estructural de exopolisacáridos del *biofilm*, permitiendo la fijación del polímero al exterior de la superficie bacteriana (Aricola y col., 2015).

1.6.2.2 Gen *bap*.

El gen *bap* codifica a una gran proteína de 2.276 aminoácidos que promueve tanto la adherencia primaria a superficies inertes y la adhesión intercelular, en contraste con el PIA/PNAG que principalmente involucra la adhesión intercelular. La formación de la proteína Bap se ha descrito como un mecanismo alternativo independiente de *ica* para la formación de *biofilms* por parte de aislados de *S. aureus* causantes de mastitis (Ubeda y col., 2003; Cucarella y col., 2004; Lasa y Penadés, 2006).

Cucarella y col. (2002) demostraron que Bap interfiere con la actividad de las proteínas MSCRAMMs disminuyendo: la adhesión a fibrinógeno y fibronectina, la adherencia al tejido glandular mamario en ensayos *ex vivo*, la internalización a células epiteliales y la colonización inicial de la GM en ovejas. Por su parte, Valle y col. (2012) demostraron que la proteína Bap promueve la adhesión de *S. aureus* a las MAC-T; sin embargo, previene la entrada de la bacteria a las mismas. Por otra parte, bacterias deficientes en Bap mostraron una capacidad aumentada para invadir las CEM en un modelo de mastitis en ratón. Estos hallazgos, sumados a los de trabajos previos (Cucarella y col., 2001; Ubeda y col., 2003; Cucarella y col., 2004), demuestran que Bap afecta la colonización inicial del tejido mamario promoviendo la formación de agregados bacterianos que sobreviven adheridos a las CEM y evadiendo al sistema inmune por el enmascaramiento de los antígenos de superficie, lo cual facilitaría la persistencia de *S. aureus* a largo plazo.

1.6.2.3 Tipo *Agr*.

En el género *Staphylococcus*, el sistema que regula la expresión de los FV en respuesta a la densidad celular es el sistema regulador de genes accesorio (*agr*) (Recsei y col., 1986). El sistema *agr* puede regular la expresión de proteínas de superficie y factores de virulencia extracelulares (Moodley y col., 2006). Este sistema incluye AgrD, el octapéptido de señalización producido en alta densidad celular; AgrB, una proteína transmembrana responsable de la secreción, exportación y procesamiento de AgrD activo; y AgrC, un receptor de membrana que activa el mecanismo de fosforilación de AgrA cuando se une a AgrD. El AgrA fosforilado regula positivamente la producción de la molécula efectora ARN III (Geisinger y col., 2012). El sistema *agr* es polimórfico y permite la clasificación de cepas de *S. aureus* en cuatro grupos (AgrI, AgrII, AgrIII, y AgrIV) en base a la especificidad del péptido autoinducido (AIP) para el receptor de señal AgrC (Mayville y col., 1999; Shopsin y col., 2003; Buzzola y col., 2007).

El sistema Agr responde a la densidad bacteriana “quorum sensing” (del inglés percepción de quorum), de manera que, durante la fase post-exponencial de crecimiento, cuando aumenta el número de bacterias, se estimula la transcripción de RNAIII, que es la molécula efectora de este sistema regulador (Yarwood y Schlievert, 2003; Cheung y col., 2004). Como resultado, se inhibe la expresión de proteínas superficiales y se activa la expresión de toxinas y enzimas extracelulares (α -toxina, β -toxina, lipasas, proteasas), factores de virulencia relacionados con la adquisición de nutrientes, la supervivencia y la diseminación bacteriana. Al mismo tiempo la producción de nucleasas y proteasas colaboran en la liberación de bacterias que forman parte de *biofilms* (Novick y Geisinger, 2008; Otto, 2013). Parte de los transcritos de RNAIII se traducen para producir delta-hemolisina (Hld), que es una de las modulinas fenol-solubles involucradas en la reestructuración del *biofilm* (Periasamy y col., 2012).

1.6.3 Genes de resistencia a los antibióticos.

Se considera que el uso excesivo de agentes antimicrobianos en humanos y en medicina veterinaria ha sido una importante causa para favorecer la emergencia y diseminación de bacterias multiresistentes. *Staphylococcus aureus* puede sobrevivir a la acción de los los agentes antimicrobianos debido a la portación de varios genes de resistencia (Peacock y col., 2002). La resistencia a la penicilina desarrollada por los estafilococos está mediada por dos mecanismos: por la secreción de una enzima β -lactamasa que inactiva el antibiótico por hidrólisis de su anillo de β -lactámico, y está

codificada por el gen *blaZ* en un plásmido o cromosoma (Olsen y col., 2006), o por la producción de una proteína de unión a penicilina (PBP2A) codificada por el gen *mecA*, incrustado en un elemento genético móvil en el cromosoma bacteriano llamado *Staphylococcus Chromosome Cassette mec* o SCCmec (Moon y col., 2007).

1.6.3.1 Gen *blaZ*.

La resistencia de *S. aureus* a la bencilpenicilina es causada principalmente por el gen *blaZ* que codifica la producción de betalactamasas, que hidrolizan los betalactámicos. La penicilina G ha sido considerada la droga de elección para tratar la IIM por *S. aureus*; sin embargo, aislados resistentes fueron detectados, y se informó que su prevalencia varía ampliamente entre los países de 18 a 100% (Aarestrup y Jensen, 1998; De Oliveira y col., 2000; Russi y col., 2008; Persson y col., 2011). La producción de β -lactamasa se considera el mecanismo más frecuente de resistencia a la penicilina entre los *S. aureus* aislados de IIM en bovinos (Haveri y col., 2005; Olsen y col., 2006; Persson y col., 2011). Este tipo de resistencia en *S. aureus* puede surgir a través de dos mecanismos: la propagación de clones resistentes o mediante la diseminación horizontal de los elementos móviles que contienen el gen *blaZ* (Holzbauer y Chiller, 2006; Malachowa y DeLeo, 2010).

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

1.6.3.2 Gen *mecA*.

Los *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) son uno de los principales patógenos oportunistas a nivel hospitalario en medicina humana, y algunos linajes específicos están surgiendo en el ganado y relacionados a las granjas. Los MRSA representan un problema de salud pública importante porque podrían transferirse a los humanos a través de la cadena alimentaria y podría contaminar la leche y los productos lácteos causando enfermedades transmitidas por los alimentos (Wang y col., 2015). Además, los animales podrían portar cepas de *S. aureus* implicados en infecciones zoonóticas (Klibi y col., 2018). La resistencia a meticilina en *S. aureus* es conferida por la expresión del gen *mecA*, que también causa

resistencia a la mayoría de los β -lactámicos (Türkyılmaz y col., 2010; Bardiau y col., 2013). La resistencia a β -lactámicos en *S. aureus* es una causa importante del fracaso de los tratamientos de infecciones en humanos y animales. La transferencia horizontal de genes de resistencia a los antimicrobianos entre las cepas del ganado y las asociadas a los humanos es un problema cada vez mayor para la salud pública (Brody y col., 2008), considerando que en los últimos años, han aparecido reportes de casos de mastitis bovina producidos por *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) en diferentes partes del mundo (Moon y col., 2007; Turutoglu y col., 2009; van Duijkeren y col., 2013).

1.7 Persistencia de las infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus*.

Las IIM persistentes por *S. aureus* se asocian frecuentemente con episodios clínicos recurrentes y aumentos a largo plazo en el RCS de la leche. Las cepas persistentes a menudo expresan conjuntos de genes que se relacionan con su adaptación al medio intramamario y permiten la supervivencia intracelular y la subsiguiente modulación de los mecanismos de defensa del hospedador (Atalla y col., 2010).

Como se ha mencionado, la persistencia intracelular de *S. aureus* ha sido descrita en macrófagos así como también en fagocitos no profesionales tales como células epiteliales, queratinocitos y células endoteliales (von Eiff y col., 2001; Clement y col., 2005; Kubica y col., 2008). Una gran variedad de factores bacterianos han sido asociados con la persistencia intracelular incluyendo a reguladores globales como el sistema Agr, al factor alternativo SigB, la α -toxina y la habilidad de formar fenotipos bacterianos alterados o SCV, entre otros (Atalla y col., 2009). La forma de vida intracelular puede facilitar la persistencia de *S. aureus* en la GM, protegiendo a la bacteria de los tratamientos antimicrobianos y de las defensas inmunes del hospedador (Sendi y Proctor, 2009).

Luego de la internalización en las células epiteliales *S. aureus* es capaz de sobrevivir en vacuolas endocíticas evitando la fusión lisosomal. En este ambiente los organismos pueden replicarse o escapar del endosoma, multiplicándose en el citoplasma de la célula hospedadora (Bayles y col., 1998; Qazi y col., 2001). En un estudio reciente, utilizando una línea celular de macrófagos humanos, Jubrail y col. (2016) demostraron que una acidificación disminuida en el fagolisosoma se asoció con una falla en la maduración fagosomal y una reducción en la actividad de la enzima catepsina-D, lo cual conduce a la inhibición de la apoptosis y a la persistencia de *S. aureus* en los macrófagos.

Por otra parte, en estudios previos sobre IIM persistentes causadas por *S. aureus* se ha observado que las cepas que causan este tipo de infección difieren de las que causan infecciones transitorias. Estas diferencias entre cepas fueron observadas usando técnicas de tipificación molecular descriptivas (Haveri y col., 2008; Fournier y col., 2008; Graber y col., 2009; Ote y col., 2011), encontrándose, además, diferencias funcionales en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Buzzola y col., 2007; Atalla y col., 2009; Lewandowska-Sabat y col., 2013; Bardiau y col., 2014; 2016). Por su parte, Schukken y col. (2011) sugieren que la adaptación de las cepas dominantes al hospedador daría lugar a infecciones asociadas con patrones de enfermedad clínicamente menos severa y mayor oportunidad de permanencia y transmisión en el rodeo. Dado que diferentes cepas de *S. aureus* utilizan estrategias de infección y supervivencia únicas, se ha teorizado que la respuesta inmune del hospedador también variará de acuerdo con la cepa infectante (Kim y col., 2011).

Estudios previos basados en infecciones experimentales con la misma cepa y tamaño del inóculo, han demostrado una gran variabilidad individual entre animales en lo que respecta al curso, la duración y la gravedad de la mastitis (Plommet y Le Gall, 1963). En particular, no se han esclarecido completamente los primeros eventos que tienen lugar durante la fase de latencia de la enfermedad, desde la intrusión de *S. aureus* al microambiente de la GM hasta el inicio de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, el estudio de la expresión temporal de los diversos FV a medida que avanza la infección sería de gran utilidad. Además, la proporción de bacterias intracelulares que sobreviven el escape del fagolisosoma y la propensión de las bacterias citosólicas a adoptar el fenotipo SCV son cuestiones sin resolver (Sinha y Fraunholz, 2010). La abundancia de datos de experimentos *in vitro* contrasta con la escasez de evidencia basada en datos *in vivo* o *ex vivo*, en cuanto a la adhesión e invasión a CEM, supervivencia intracelular en fagocitos, desarrollo de *biofilm* o la contribución de SCV a la resistencia a los tratamientos antimicrobianos (Rainard y col., 2017).

1.8 Mecanismos de defensa de la GM bovina.

Los mecanismos de defensa de la GM bovina involucran diversos factores anatómicos, celulares y moleculares asociados a este tejido que se engloban dentro de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Ambos mecanismos de respuesta interactúan en forma coordinada en un intento de proporcionar protección contra los microorganismos causantes de mastitis (Rainard y Riollot, 2006). En oposición con el

sistema inmune adaptativo, que requiere varios días para ejercer una respuesta protectora, el sistema inmune innato está preparado para responder inmediatamente en los primeros minutos a horas luego de una invasión microbiana. De este modo, el sistema inmune innato representa la primera línea de defensa inmunológica activa contra patógenos invasores una vez que han penetrado las barreras anatómicas del canal del pezón. La rapidez y la magnitud de esta respuesta influyen en la resolución de las IIM, como así también en la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa (Aitken y col., 2011; Nickerson y Sordillo, 2017).

La interacción entre el sistema inmune del hospedador y los patógenos causantes de mastitis es intrincada, ya que ambos han logrado co-evolucionar para reconocer, responder y adaptarse al otro. Como tal, los patógenos microbianos han desarrollado diversas estrategias para alterar y evadir las defensas del hospedador con el fin de sobrevivir. Por otra parte, el sistema inmune del hospedador también posee la capacidad de adaptarse y dispone de un gran arsenal para controlar o eliminar la amenaza microbiana. Aun así, es ampliamente aceptado que la susceptibilidad de los individuos dentro de una especie determinada difiere para un mismo patógeno microbiano (Thompson-Crispi y col., 2014).

Las bacterias expresan un gran repertorio de FV que se producen en concentraciones variables dependiendo de la etapa de infección (Bharathan y Mullarky, 2011) y que en parte determinan las diferencias en la magnitud y la duración de la respuesta inmune del hospedador (Thompson-Crispi y col., 2014). Esta variabilidad en la interacción patógeno-hospedador está controlada por la composición genética inherente del hospedador, incluidas las respuestas inmunes innatas y adaptativas, particularmente la memoria inmunológica adquirida, así como por la naturaleza del agente patógeno (Hermann, 2007).

1.8.1 Inmunidad innata.

En la GM bovina, la inmunidad innata constituye la primera línea de defensa contra los patógenos causantes de mastitis y su sello distintivo es la inflamación. Cuando las defensas innatas responden en forma adecuada, los patógenos son eliminados en un corto periodo de tiempo y la respuesta inflamatoria se resuelve rápidamente (Nickerson y Sordillo, 2017).

Los principales efectores celulares dentro del sistema inmune mamario son las células somáticas (Paape y Capuco, 1997), que se reclutan del torrente sanguíneo en cantidades variables dependiendo del patógeno involucrado (Kehrli y col., 1994; Sordillo y Streicher, 2002; de Haas y col., 2004). Los patógenos Gram negativos, tales como *E. coli* provocan una respuesta inflamatoria rápida y de gran magnitud a través de una estimulación vigorosa de la síntesis de citoquinas y otros mediadores endógenos, lo que resulta en la activación completa de la respuesta inmune local y generalizada del hospedador (Burvenich y col., 2003; Jensen y col., 2013). Por otra parte, *S. aureus* y otros patógenos Gram positivos provocan una respuesta inflamatoria retardada y de menor magnitud en la GM y generalmente ninguna reacción sistémica (Günther y col., 2017). Como resultado, estas infecciones muy a menudo pueden volverse persistentes (Hensen y col., 2000).

Las defensas innatas contra los patógenos de la mastitis consisten en barreras anatómicas provistas por el canal del pezón, barreras celulares como los leucocitos de la leche y tejidos con sus receptores celulares y barreras solubles compuestas por una variedad de factores moleculares no celulares (Tabla 1).

1.8.1.1 Defensas anatómicas.

El canal del pezón es la primera línea de defensa anatómica contra los patógenos causantes de mastitis. Este canal está sellado entre ordeños y en el período seco por un recubrimiento de queratina derivado del propio epitelio de revestimiento estratificado del canal. El recubrimiento de queratina constituye una barrera física que impide la penetración de las bacterias. Además, la queratina es capaz de unirse e inmovilizar a la mayoría de las cepas de bacterias no capsuladas causantes de mastitis (Craven y Williams, 1985). Adicionalmente, algunos componentes de la queratina pueden tener actividad microbicida, aunque la eficacia bactericida de la queratina entera puede ser limitada (Craven y Williams, 1985). Durante el ordeño la leche elimina el recubrimiento de queratina, y el canal del pezón se distiende por el vacío y el flujo de leche. Después del ordeño, se requieren 2 horas para que el esfínter se contraiga y se cierre el canal del pezón (Schultze y Bright, 1983). Por otra parte, la máquina ordeñadora puede dañar mecánicamente y producir disturbios circulatorios en el pezón. Lesiones en la piel y en el canal del pezón, son factores que predisponen a la colonización por bacterias tales como *S. aureus*, y que pueden resultar en una nueva IIM.

Tabla 1. Resumen de los mecanismos de defensa innatos de la glándula mamaria bovina (Adaptado de Nickerson y Sordillo, 2017).

Tipo	Factor	Mecanismo
Anatómica	Esfínter del pezón	El esfínter muscular provee una barrera mecánica para evitar la entrada bacteriana La queratina impide el crecimiento bacteriano y la entrada a la glándula La roseta de Füssenberg esta densamente poblada por leucocitos; defensa no definida aún
Celular	Neutrófilos	Fagocitosis y destrucción bacteriana; secretan factores antibacterianos; forman NETs
	Macrófagos	Fagocitosis y destrucción bacteriana; secretan citocinas y oxilípidos
	Células dendríticas	Fagocitosis y producción de citoquinas
	Células Natural killer	Linfocitos no inmunes que secretan proteínas antibacterianas en la GM
Soluble	Células epiteliales	Expresión de TLR que sensa la presencia de bacterias en la GM
	Citoquinas	Factores proinflamatorios que incrementan la actividad de los leucocitos
	Complemento	Bacteriolítico y facilita la fagocitosis
	Lactoferrina	Propiedades bacteriostáticas debido al secuestro de hierro

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos; GM: glándula mamaria; TLR: receptores tipo Toll.

1.8.1.2 Defensas celulares innatas.

Si las bacterias son capaces de atravesar el esfínter del pezón y penetrar en el canal del mismo, la segunda línea de defensa consiste en las células del sistema inmune innato, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CD), células asesinas naturales o *natural killer* (NK), así como las CEM (Figura 3). El número y actividad de las poblaciones leucocitarias juega un rol vital en la determinación de la severidad y duración de las IIM (Oviedo-Boysó y col., 2007).

La mastitis induce leucocitosis en la leche y los PMN neutrófilos son el tipo celular predominante tanto en mastitis agudas como crónicas. Los neutrófilos juegan un rol clave en las defensas de la GM y su rápida movilización desde la sangre hacia la leche es crucial para prevenir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido y la subsecuente mastitis aguda (Burvenich y col., 2007; Sordillo, 2018). Durante la mastitis, la proporción de neutrófilos aumenta dramáticamente y a menudo constituye más del 90% de las células en la leche (Sandholm y Helsingin, 1995).

Los neutrófilos bovinos atraviesan el epitelio de la GM por diapédesis sin causar daño a las células epiteliales a menos que la migración sea extensa (Lin y col., 1995), en cuyo caso tanto el daño mecánico como químico son posibles (Akers y Nickerson, 2011). Los neutrófilos poseen una membrana con un número de receptores funcionalmente importantes: 1) moléculas de adhesión L-selectina y β 2-integrina, que promueven la unión a células endoteliales para facilitar su migración hacia el foco de infección y 2)

receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG e IgM y para los componentes del complemento, C3b y C3bi (Ezzat Alnakip y col., 2014), que median la primera función que cumplen los neutrófilos en la GM, que es fagocitar microorganismos (Rainard y Riollet, 2006).

Los macrófagos son un tipo celular importante en la leche, la secreción de la ubre en involución y en el tejido mamario (Jensen y Eberhart, 1981; McDonald y Anderson, 1981; Sordillo y col., 1987). Son células fagocíticas activas en la GM, que ingieren bacterias, restos tisulares y componentes de la leche (Sordillo y Nickerson, 1988) y además, son importantes células presentadoras de antígenos (CPA). Siguiendo a la diapédesis de los neutrófilos, los macrófagos inician su principal función de fagocitosis y destrucción del patógeno que se asocia a la liberación de numerosos mediadores inflamatorios (Burvenich y col, 2004). Durante la fagocitosis, los macrófagos también liberan numerosas sustancias que pueden dañar la superficie de la mucosa de la GM. El tejido dañado será reemplazado por tejido fibroso con la consecuente disminución del número de células secretoras (Turk y col., 2017). Los macrófagos en la leche y el tejido mamario reconocen los productos bacterianos y después del procesamiento interno, se activan y liberan citoquinas pro-inflamatorias que desencadenan la respuesta de fase aguda y la inmunidad adaptativa (Andersson, 2004). Sin embargo, son menos activos que los neutrófilos de leche en la fagocitosis, y ambos tipos de células de leche son menos eficientes que sus contrapartes de sangre (Mullan y col., 1985). Las capacidades funcionales de los macrófagos de la GM disminuyen notablemente durante el período del parto, y esta alteración se ha relacionado con una mayor incidencia de mastitis (Sordillo y Streicher, 2002; Waller, 2000).

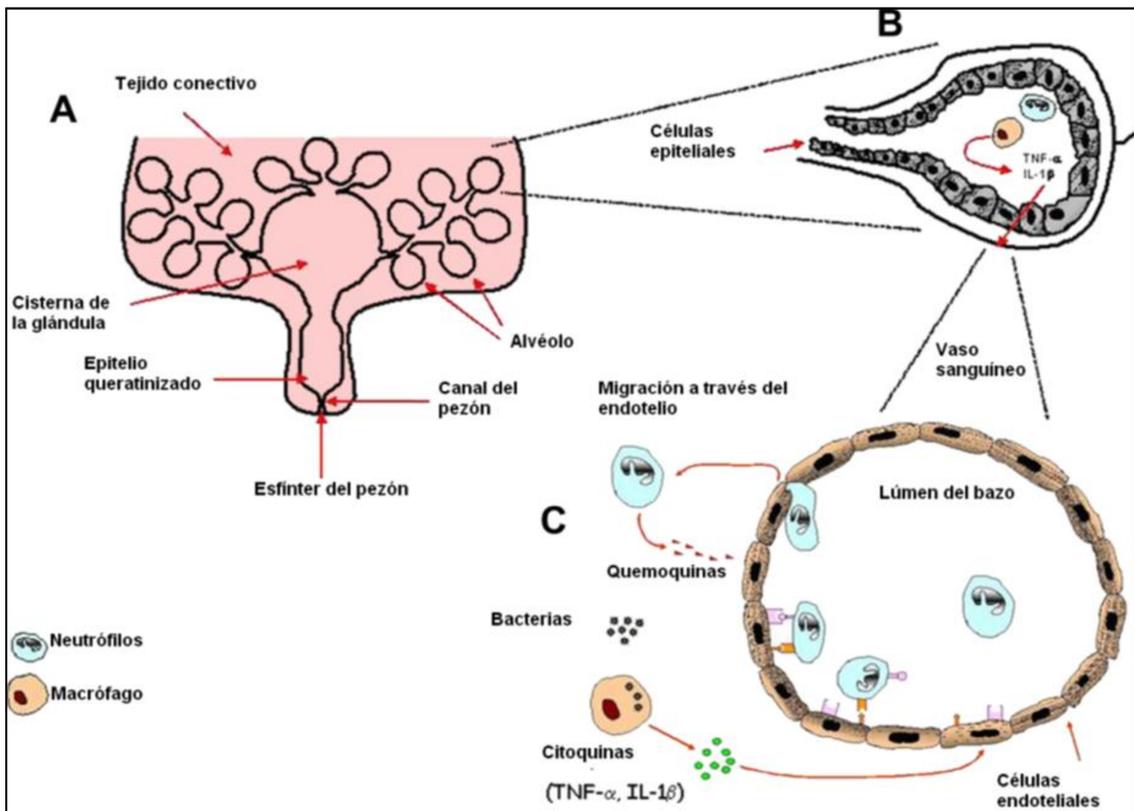


Figura 3. A. Esquema que muestra las defensas anatómicas más importantes en la glándula mamaria bovina que actúan como barrera. B. Defensas celulares y solubles que participan en la respuesta inmune innata de la glándula mamaria. Los macrófagos localizados en los alvéolos mamarios fagocitan bacterias ubicadas en la cisterna de la glándula. Estos macrófagos activados liberan citoquinas como factor de necrosis tumoral-alfa ($TNF-\alpha$) e interleuquina-1beta ($IL-1\beta$). C. Las células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes a los alvéolos expresan moléculas de adhesión en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias y facilitan el reclutamiento de neutrófilos provenientes del flujo sanguíneo al sitio de infección para eliminar bacterias invasoras. Asimismo, las células epiteliales mamarias (CEM) presentan funciones de reconocimiento de patógenos. (Adaptado de Oviedo-Boyso y col., 2007).

Las CEM que revisten el canal del pezón, la cisterna de la glándula y los alvéolos constituyen en conjunto las primeras células que reconocen a los patógenos y participan en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria en la GM. Estas células expresan receptores de reconocimiento de patrones (RRP), principalmente receptores tipo *toll* (TLR) (Alva-Murillo y col., 2012). En respuesta a una estimulación bacteriana las CEM secretan moléculas efectoras y mediadores inflamatorios de la inmunidad innata. Se observó que pueden secretar IL-8 y otros componentes de defensa como defensinas,

metabolitos de ácido araquidónico y lactoferrina (Lf), entre otros (Rinaldi y col., 2010, Smolenski y col., 2011, Alva-Murillo y col., 2012, Wellnitz y col., 2012, Ezzat Alnakip y col., 2014).

Durante la respuesta inflamatoria los neutrófilos y macrófagos liberan enzimas, mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) por los cuales se promueve la eliminación de las bacterias, pero también ocasionan daño en el tejido que los rodea (Pham, 2006). Como consecuencia de la acumulación de ROS puede desarrollarse el estrés oxidativo. Excesivas cantidades de ROS y otros productos del estrés oxidativo, como los hidroperóxidos lipídicos, pueden adicionalmente contribuir a la destrucción celular y tisular (Ryman y col., 2015). Además, el incremento en la producción de ROS en leche, afecta sus propiedades organolépticas y reduce directamente la calidad de la misma (Lykkesfeldt y Svendsen, 2007).

Otro componente que forma parte del proceso inflamatorio en la mastitis bovina es el óxido nítrico (NO, *nitric oxide*). La síntesis de NO se produce por acción de una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS, *nitric oxide synthase*), a partir del aminoácido L-arginina. El NO controla varias funciones fisiológicas del cuerpo y constituye un importante mecanismo de defensa del hospedador para destruir microbios. El efecto antimicrobiano del NO es debido al peroxinitrito, metabolito nitrogenado reactivo, derivado de la oxidación del NO. Los macrófagos y células epiteliales de la GM producen cantidades significativas de NO que toma parte en el proceso inflamatorio (Boulanger y col., 2001). Numerosos trabajos reportaron un incremento significativo en los niveles de NO en secreciones mamarias provenientes de mastitis subclínicas y clínicas (Komine y col., 2004; Osman y col., 2010a; 2010b). El NO puede sintetizarse endógenamente a partir de la arginina mediante 2 óxido nítrico sintasas constitutivas (endoteliales y neuronales) (cNOS) y una NOS inducible (iNOS). iNOS se expresa especialmente en monocitos, como resultado de la activación con sustancias de origen microbiano, tales como LPS y por citoquinas, por ejemplo, el TNF- α (Onoda y Inano, 1998; Blum y col., 2000; Boulanger y col., 2001).

1.8.1.3 Defensas solubles.

Numerosos factores solubles se han asociado con las defensas innatas de la GM. Entre ellos se encuentran diversos elementos contenidos en la leche con acción sobre las bacterias, tales como: lisozima, Lf y lactoperoxidasa.

El sistema de complemento está presente en suero y leche, y cumple un papel importante dentro de los mecanismos inmunológicos solubles de la GM. El complemento es una familia de proteínas y fragmentos proteolíticos derivadas de ellas, que ejercen numerosas funciones inmunológicas, entre ellas: opsonización de microorganismos, quimiotaxis de PMN y lisis de bacterias (Foster, 2005).

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de proteínas sintetizadas naturalmente por una amplia variedad de células, principalmente por células inmunes, que actúan como mensajeros químicos de la respuesta inmunológica (Oviedo-Boyso y col., 2007). Las citoquinas pro-inflamatorias promueven la inflamación rápidamente después del reconocimiento del patógeno, mientras que las citoquinas anti-inflamatorias suprimen y limitan la actividad de las citoquinas pro-inflamatorias.

Una gran variedad de citoquinas, tales como IL, factor estimulante de colonias, IFN- γ y el TNF- α han sido encontrados en GM sana e infectada (Oviedo-Boyso y col., 2007). Entre ellas, las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α y las quimioquinas IL-8 y CCL-2 promueven la inflamación (Schukken y col., 2011).

La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria producida por monocitos, macrófagos, CD, linfocitos, células epiteliales y endoteliales y fibroblastos. La expresión de IL-1 β es inducida en respuesta a bacterias, virus, hongos y parásitos, como así también por fuentes no microbianas como: TNF- α , IL-12 y componentes del complemento (C5a). Además de ser inducida por otras citoquinas, IL-1 β provoca la producción de otras citoquinas tales como TNF- α , IL-6, IL-8 y IL-12 (Bannerman, 2009). Durante la respuesta inflamatoria, esta citoquina regula la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales y la quimiotaxis de neutrófilos en infecciones causadas por *Escherichia coli*. El rol de la IL-1 β en infecciones causadas por *S. aureus* es importante solo en etapas tempranas (Oviedo-Boyso y col., 2007).

El TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria secretada a partir de muchos tipos de células, incluyendo macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales. Esta citoquina participa de la actividad quimiotáctica de los neutrófilos ya que induce la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales. Es la principal citoquina producida en momentos tempranos de la respuesta inmune innata y además es responsable del desarrollo de fiebre y shock séptico en mastitis hiperaguda producida por bacterias coliformes (Oviedo-Boyso y col., 2007).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica con propiedades anti y pro-inflamatorias. Es uno de los mediadores clave de la "respuesta de fase aguda" en la inflamación (Günther y col.,

2009). Esta citoquina es producida por macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos, y su expresión es inducida por bacterias y virus, como así también por citoquinas tales como IL-1 β y TNF- α (Oviedo-Boyso y col., 2007; Bannerman, 2009). Su presencia es activa en mastitis causadas por bacterias coliformes, mientras que es insignificante en las IIM causadas por *S. aureus* (Alluwaimi y col., 2003).

La IL-4 ejerce una acción antagonista para IFN- γ y su función principal es la regulación de respuestas inmunes mediadas por IgE. Además, IL-4 estimula la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th2, es decir, la respuesta inmune humoral (Fonseca y col., 2009). Los transcritos de esta citoquina no fueron detectados en leche de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus* (Riollet y col., 2001).

1.8.2 Inmunidad adaptativa.

La iniciación y la regulación de la respuesta inmune adaptativa son fundamentales para la resolución de la infección. Si la bacteria invasora de la GM sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada, luego de un corto periodo, por linfocitos T y B (Tabla 2). Los linfocitos pueden reconocer una amplia variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana que definen la especificidad, diversidad, memoria y reconocimiento de lo propio y no propio del sistema inmune (Nickerson y Sordillo, 2017).

Tabla 2. Resumen de los mecanismos de defensa adaptativa de la glándula mamaria bovina (Adaptado de Nickerson y Sordillo, 2017).

Tipo	Subpoblación	Funciones
Linfocitos T	Células Th	Luego del reconocimiento del antígeno a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) producen citoquinas inmunoregulatorias; células de memoria seguido al reconocimiento de antígenos.
	Células Tc	Lisis de células dañadas del hospedador cuando se unen con moléculas del CMH; producen citoquinas y limitan las funciones de los leucocitos.
	Células T $\gamma\delta$	Su rol biológico no está bien establecido en la GM.
Linfocitos B	Células B maduras	Células de memoria seguido al reconocimiento de antígenos.
	Células plasmáticas	Célula B diferenciada que sintetiza y secreta anticuerpos contra un antígeno específico.
Inmunoglobulinas	IgG1	Transporte selectivo hacia las secreciones mamarias; opsonización de bacterias para aumentar la fagocitosis.
	IgG2	Transportada dentro de las secreciones mamarias durante la diapédesis de los neutrófilos; opsonización de bacterias para aumentar la fagocitosis.
	IgA	Puede causar aglutinación bacteriana; previene la adhesión bacteriana; neutraliza toxinas.
	IgM	Fijación de complemento (C); opsonización, aglutinación, neutralización de toxinas; opsonina para neutrófilos en presencia de C.

Los linfocitos T reconocen los componentes antigénicos a través de receptores de membrana y son los responsables de la regulación y efectividad de la respuesta inmune (Janeway y col., 2001). Del total de linfocitos sanguíneos, la subpoblación de células T es la predominante en los rumiantes, llegando a representar hasta un 80% del total (Tizard, 2009). Los linfocitos T pueden dividirse en dos grandes poblaciones, dependiendo de la expresión de marcadores de superficie y del tipo de citoquina secretada: los linfocitos T $\alpha\beta$, los cuales a su vez pueden ser subdivididos en T *helper* (Th) o colaboradores (CD4+) y T citotóxicos (CTL) (CD8+), y los linfocitos T $\gamma\delta$. En la GM bovina sana predominan los linfocitos T $\alpha\beta$ que expresan el fenotipo CD8+ fundamentalmente, en contraste con los de sangre periférica que expresan primariamente el fenotipo CD4+ (Asai y col., 1998). En el tejido glandular mamario de animales sanos, los linfocitos T CD4+ se localizan en la porción interalveolar, mientras que los linfocitos T CD8+ se encuentran principalmente rodeando a los alvéolos (Leitner y col., 2003).

Los linfocitos Th vírgenes o *naive* (Th0) son activados mediante el reconocimiento de un péptido o antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, presentado por las CPA mediante la interacción con el TCR (*T cell receptor*). Después de la activación, las células Th0 comienzan a dividirse y / o dan lugar a un clon de células efectoras, cada una específica para el mismo antígeno presentado en el mismo

CMH II (Goldsby, 2003). Estas células Th efectoras son CD4+ y se pueden dividir en cinco subtipos principales, con diferentes fenotipos de secreción de citoquinas que provocan características funcionales únicas para cada tipo: células tipo Th1, Th2, Th17, T regulatorias (Treg) y T *helper* foliculares (TFH). En la tabla 3 se resumen las diferentes subclases de linfocitos T y sus funciones principales.

Tabla 3. Diferenciación y funciones de las diferentes subclases de linfocitos T (Adaptado de Bröker y col., 2016).

	Citoquinas inducidas	Linaje-Factor de transcripción específico	Citoquinas secretadas	Principales funciones
TH1	IL-12, IFN- γ	Tbet	IFN- γ , IL-2 IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	Activa macrófagos; Ayuda a células T CD8+
TH2	IL-4 TGF- β , IL1- β , IL-6, IL-21, IL-23	Gata3	IL-17, IL-6	Reclutamiento de eosinófilos, orquesta la inflamación tipo2 Potencia la respuesta de neutrófilos; Ayuda a células B en mucosas (IgA)
TH17	IL-6, IL-21, IL-23	ROR γ T	IL-21 y otras	Ayuda a células B (cambia la clase de anticuerpos a IgG, IgA e IgE; madura la afinidad de los anticuerpos)
TFH	TGF- β	Bcl6	TGF- β , IL-10	Suprime la respuesta de células T; Ayuda las células B en mucosas (IgA)
Treg	TGF- β	Foxp3	IL-2, IFN- γ	Mata células infectadas
CTL				

CTL: Linfocitos T citotóxicos; THF: Células T helper foliculares; TH: Células T helper; Treg: células T regulatorias.

En términos generales, las células Th1 median en una respuesta inmune celular y las células Th2 potencian una respuesta humoral. Las poblaciones Th1, Th2 y Th17 y las citoquinas que liberan, son antagónicas entre sí y uno u otro subtipo es dominante en un momento dado en respuesta a un patógeno particular (Kaiko y col., 2008).

Durante los estadios tempranos de la infección por *S. aureus*, células del sistema inmune innato del hospedador, como macrófagos, producen citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 p70, IL-18 y TNF- α (Buzás y col., 2004). Este ambiente de citoquinas impulsa una respuesta de tipo Th1 y Th17 por parte de linfocitos TCD4+ que, de manera exacerbada, puede resultar en un daño sustancial a los tejidos del hospedador.

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

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

Durante las IIM causadas por *S. aureus*, se produce un incremento en ambos tipos de linfocitos. Cuando la infección ya se ha establecido, predomina el reclutamiento de linfocitos T CD8+, lo que sugiere que este tipo de linfocitos desempeña una importante función en mastitis crónicas causadas por *S. aureus* (Riollet y col., 2001; Rivas y col., 2002; Grönlund y col., 2006; Oviedo-Boyso y col., 2007).

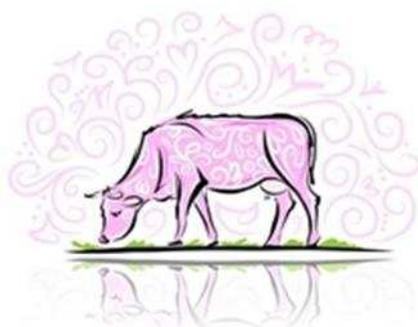
Las células T $\gamma\delta$ no han sido bien caracterizadas, pero se sugiere que tendrían capacidad citotóxica, lo que las convertiría en una importante línea de defensa contra agentes infecciosos, particularmente patógenos intracelulares (Skyberg y col., 2011). Soltys y Quin (1999) mostraron un aumento de estas células en sangre durante IIM estafilocócicas. Tanto en humanos como en bovinos, se ha propuesto que las interacciones que desencadenan la activación de las células T $\gamma\delta$ serían independientes del CMH y dependientes del Receptor de células T (TCR). Además, estas células podrían ser directamente activadas por PAMPs en ausencia de CPA, lo cual tendría implicancia en la respuesta inmune innata (Plattner y Hostetter, 2011). La contribución de las variaciones de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la inmunidad global de la GM no está del todo clara, debido a que las funciones biológicas de estas células son aún especulativas (Nickerson y Sordillo, 2017; Sordillo, 2018).

El principal rol de los linfocitos B es el de producir anticuerpos contra patógenos invasores. A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, los linfocitos B utilizan los receptores de membrana para reconocer antígenos específicos (Sordillo y col., 1997). De manera similar a los macrófagos y CD, estos linfocitos pueden funcionar como CPA. Los linfocitos B internalizan, procesan y presentan el antígeno en el contexto del CMH-II a

los linfocitos T CD4+. Después de la presentación del antígeno procesado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce a su vez proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células B de memoria. A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B, permanecen constantes durante la lactancia (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996).

En base a los antecedentes descriptos se desprende la necesidad de resolver numerosos interrogantes sobre la patogenia de las IIM causadas por *S. aureus*. Como ejemplo, no está claro si las discrepancias observadas en la gravedad de las mastitis entre vacas, son el resultado de las diferencias en el repertorio de FV que expresan las cepas, la interacción patógeno-hospedador o la respuesta inmune del hospedador. Asimismo, los FV y los factores reguladores globales que se expresan durante el desarrollo de la infección y contribuyen a la adaptación y persistencia intracelular de *S. aureus* en la GM bovina no han sido estudiados aún. En las mastitis por *S. aureus* son numerosos los factores que intervienen en la modulación del proceso infeccioso hacia la resolución o hacia la cronicidad. El conocimiento del perfil molecular de las cepas, podría ser una herramienta que permita exponer los patrones de genes de virulencia más prevalentes en los rodeos lecheros, y avanzar en la elucidación del mecanismo de la patogénesis de la mastitis por *S. aureus*. Esto será fundamental para el desarrollo de estrategias superadoras para protocolos de profilaxis y control de las mastitis causadas por este patógeno.

2 Objetivos e hipótesis



2.1 Objetivo general

Estudiar diferentes aspectos de la compleja interacción entre genotipos bacterianos definidos y caracterizados como de alta y baja adaptación a la GM con el hospedador, para poder comprender en parte, el establecimiento y cronicidad de las IIM causadas por *S. aureus* en bovinos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Seleccionar 2 cepas de *S. aureus* con características genéticas y fenotípicas diferenciales, asociadas a IIM transitorias (de baja adaptación a la GM) y persistentes (de alta adaptación a la GM), y evaluar y comparar su habilidad de adherencia/internalización, persistencia, e inducción de daño en una línea epitelial mamaria bovina (MAC-T).

2.2.2 Evaluar y comparar la capacidad fagocítica y la respuesta inflamatoria producida luego de la interacción entre macrófagos mamarios bovinos con dos cepas de *S. aureus* con características genéticas y fenotípicas diferenciales asociadas a IIM transitorias y persistentes.

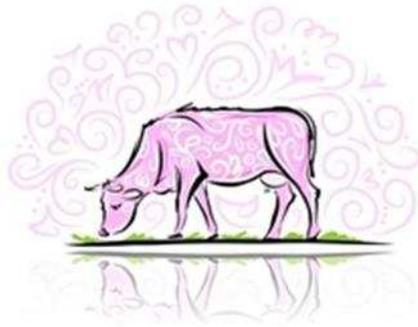
2.2.3 Desarrollar un modelo bovino de IIM experimental que refleje la habilidad de las dos cepas seleccionadas para inducir mastitis transitorias o persistentes.

2.2.4 Evaluar y comparar la evolución de la infección (transitoria o persistente) y el perfil de respuesta inmune inducido por las dos cepas seleccionadas luego de la inoculación experimental en la GM bovina.

2.3 Hipótesis

La hipótesis general planteada, es que la asociación entre genotipos de *S. aureus* y la expresión de determinados FV, favorecen la invasión, colonización y persistencia del patógeno en la GM bovina, influenciado la respuesta inmune del hospedador y determinando la evolución de la IIM (transitoria o persistente).

3 Materialles y Métodos



Para cumplir con el **objetivo específico 2.2.1** se realizaron los ensayos descriptos en el ítem 3.1. de esta sección.

3.1 Selección de cepas de *S. aureus*.

A partir de una colección de más de 300 aislamientos de *S. aureus* del cepario perteneciente al Laboratorio de Microbiología y Calidad de Leche de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), se seleccionaron inicialmente 34 cepas provenientes de vacas con infecciones intramamarias (IIM) clínicas o subclínicas. La selección de las cepas se realizó sobre la base de características clínicas y epidemiológicas, incluyendo aproximadamente el 10% de los aislados del cepario original. Los aislados de *S. aureus* provenían de diferentes tambos de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires y fueron colectados entre los años 2010 y 2014.

Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas sobre la base de datos epidemiológicos del rodeo de origen (alta o baja prevalencia de IIM por *S. aureus*, considerando alta >15% y baja <10%, en base al muestreo y posterior cultivo de leche de todos los animales en lactancia), recuento de células somáticas (RCS) promedio del tambo de origen (bajo RCS: <200.000 cél/ml y alto RCS: >500.000 cél/ml), presentación clínica de la infección (mastitis clínica o subclínica), respuesta al tratamiento antimicrobiano ante un protocolo estandarizado basado en la administración de beta lactámicos o macrólidos durante 3 días (favorable: curación bacteriológica o desfavorable: ausencia de curación bacteriológica a los 14 días post tratamiento) y producción de α y β -toxinas.

De las 34 cepas preseleccionadas, 17 fueron aisladas a partir de cuartos con mastitis clínicas y las 17 restantes a partir de cuartos con mastitis subclínicas. Se consideró como “mastitis clínica” la presencia de alteración macroscópica de la leche al momento de la toma de la muestra, con o sin signos cardinales de inflamación en la GM, tales como: enrojecimiento, aumento de la temperatura local o tumefacción del tejido mamario. Se consideró como “mastitis subclínica” cuando no se observaron cambios macroscópicos en las características de la leche, ni signos clínicos de inflamación en la GM, mostrando RCS en leche >250.000 cél/ml.

De las 34 cepas preseleccionadas, 26 fueron denominadas transitorias (T) o no persistentes (NP), de éstas últimas, 17 fueron aisladas a partir de cuartos con mastitis

clínica y 9 a partir de cuartos con mastitis subclínica. Las cepas de *S. aureus* consideradas T o NP fueron aisladas sólo una vez de un cuarto mamario y no volvieron a aislarse en dos muestreos de leche consecutivos después de la terapia con antibióticos. Estas cepas fueron consideradas como de baja adaptación a la GM bovina e indujeron IIM transitorias al no aislarse persistentemente de los cuartos afectados (Pereyra y col., 2016).

Por otra parte, de las 34 cepas preseleccionadas, 8 fueron denominadas persistentes (P) y aisladas a partir de cuartos con mastitis subclínica. Las cepas de *S. aureus* consideradas P se aislaron del mismo cuarto mamario durante tres o más muestreos de leche consecutivos cada 21 días en un período de 6 meses. Estas cepas fueron consideradas como de alta adaptación a la GM bovina e indujeron IIM crónicas o persistentes en los cuartos afectados (Pereyra y col., 2016). Para confirmar que fue la misma cepa la que persistió en cada cuarto mamario se realizó electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), cuya metodología se describe en el punto 3.1.8.

Todas las cepas preseleccionadas fueron caracterizadas fenotípicamente por pruebas estándares (Oliver y col., 2004). Los procedimientos de selección fueron realizados en la EEA Rafaela de INTA en el marco de diferentes proyectos de investigación, por lo cual, la metodología utilizada no se presenta en esta tesis. Las cepas de *S. aureus* fueron conservadas a -80°C en Caldo Tripteína Soya (CTS, Britania) y glicerol 15% V/V (Merk) hasta el momento de su uso.

La caracterización genotípica de las 34 cepas preseleccionadas, se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final y por PFGE a partir de ADN genómico. Mediante PCR se realizó la identificación molecular de especie y se evaluó la presencia de genes de virulencia. Mediante PFGE se identificaron los perfiles de restricción genómica de todas las cepas. En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron 6 cepas con perfiles genéticos diferentes. Posteriormente, las 6 cepas seleccionadas fueron caracterizadas mediante genotipificación de ADN basado en microarreglos (*Microarray-based DNA genotyping*) y utilizadas para los ensayos de invasión *in vitro* en células epiteliales mamarias bovinas transformadas (MAC-T) (*Transformed mammary epithelial cells*) (Huynh y col., 1991).

Luego de la caracterización fenotípica y genotípica se establecieron los criterios que permitieron la selección de las 2 cepas de *S. aureus* que fueron utilizadas en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La información detallada de las 34 cepas preseleccionadas se encuentra en la tabla 1 en el anexo 2. Las cepas de *S. aureus* a evaluar se reactivaron en cada ensayo según lo detallado a continuación.

✂ Cultivos microbiológicos de *S. aureus*.

3.1.1 Cultivo en medio sólido.

Las cepas de *S. aureus* fueron reactivadas mediante siembra en estrías en medio Columbia agar base (CAB, Britania) (Anexo 1), y fueron incubadas por 24 hs a 35-37°C (Figura 4).



Figura 4. Siembra en estrías de *S. aureus* en CAB.

3.1.2 Cultivo líquido para posterior extracción de ADN.

A partir del cultivo en medio sólido, se levantaron cinco colonias aisladas y de similar morfología, y se homogeneizaron en 5 ml de CTS (Anexo 1). La suspensión se incubó aproximadamente 16 hs a 37 °C y a 150 rpm de agitación (Figura 5).

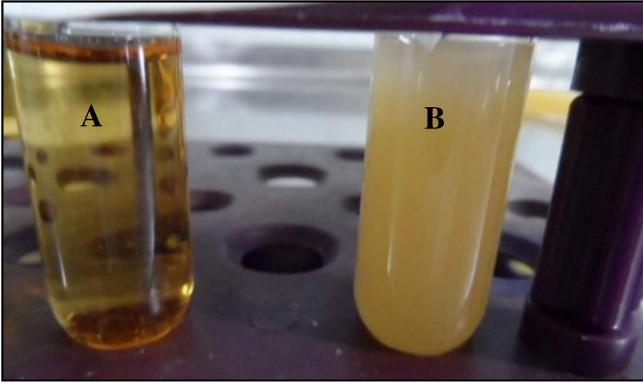


Figura 5. Crecimiento de *S. aureus* en cultivo líquido CTS. **A.** Medio sin inocular. **B.** Cultivo de *S. aureus* de 16 hs de crecimiento.

3.1.3 Cultivo líquido para medir producción de *biofilm*.

A partir del cultivo en medio sólido, se levantaron tres colonias aisladas y de similar morfología, y se homogeneizaron en 60 μ l de CTS. Veinte μ l de esta suspensión se diluyeron en 5 ml de CTS y se incubó aproximadamente 24 hs a 37 °C, sin agitación.

3.1.4 Cultivo líquido de 2 hs para ensayos de internalización.

A partir del cultivo líquido de 16 hs de incubación (ítem 3.1.3), se realizó una dilución 1/100 (4950 μ l de TSC y 50 μ l del cultivo líquido) y se incubó a 37°C por 2 hs, a 150 rpm de agitación.

✂ Caracterización genotípica de las cepas de *S. aureus*.

3.1.5 Extracción de ADN genómico.

Las cepas de *S. aureus* fueron reactivadas según lo explicado en los apartados 3.1.1. y 3.1.2. Previo a la extracción de ADN genómico, se tomaron 1,3 ml del cultivo líquido de *S. aureus* y se centrifugó a 8.000 rpm por 10 min a 4°C. El pellet bacteriano fue lavado con solución fisiológica estéril y centrifugado a 8.000 rpm por 10 min a 4°C.

La extracción de ADN genómico de *S. aureus* se realizó siguiendo la técnica descrita por Kumar y col. (2008) con modificaciones. Brevemente, el pellet obtenido se homogenizó con 250 μ l de Tris-HCL (10mM, pH8) y 12,5 μ l de lisozima (50 mg/ml, Genbiotech S.R.L.) y se incubó en baño termostático a 37°C por 2 hs. Se agregaron 20 μ l

de Proteinasa K (20 mg/ml, Genbiotech S.R.L.) y 400 µl de buffer de lisis (Anexo 1) y se colocó en baño termostático a 50°C por 1 hora. Se agregaron 250 µl de fenol (SIGMA-ALDRICH) y 250 µl de cloroformo (Emsure® Merk) (1:1) y se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase superior a un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 240 µl de cloroformo y 10 µl de alcohol isoamílico (24:1) homogeneizando por inversión hasta mezclar las 2 fases. Se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min a 4°C y luego se transfirió la fase superior a un tubo Eppendorf estéril. Finalmente, se agregaron 25 µl de NaCl 5 Mm y 2 volúmenes de etanol 95% frío. Se dejó precipitando el ADN aproximadamente 16 hs a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 rpm por 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70% a 4 °C. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min a 4 °C y se descartó el etanol. Se lavó con 500 µl de etanol 70% frío y se centrifugó a 14.000 rpm por 2 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se colocó en estufa a 37°C por 30 min. El pellet se resuspendió en 60 µl de agua Milli-Q estéril y se incubó en baño termostático a 45°C por 2 hs.

Se corroboró la correcta extracción de ADN mediante la lectura en el equipo SPECTROstar^{Nano} (BMG Labtech), y se evaluaron los siguientes parámetros: concentración de ADN en ng/µl (Densidad Óptica, DO, 260 nm), pureza (DO 280 nm), degradación del ADN o contaminación con solventes orgánicos (relación 260/230, fue aceptable un valor aproximado de 2) y la presencia de ADN disuelto o contaminación con proteínas (relación 260/280, fue aceptable un valor aproximado de 1,6 o superior).

3.1.6 Amplificación de una secuencia nucleotídica específica de *S. aureus*.

La identificación molecular de las 34 cepas de *S. aureus* pre-seleccionadas se llevó a cabo mediante PCR de punto final siguiendo el protocolo descrito por Martineau y col. (1998). El par de oligonucleótidos utilizado amplifica un fragmento especie-específico con una longitud de 108 pares de bases (pb). Las características del par se muestran en la tabla 4. El programa *Primer Blast* indicó que los oligonucleótidos amplifican una región que codifica para una proteína de la familia de las glutamato sintetasas.

Tabla 4. Nombre, secuencia y características del par de oligonucleótidos utilizados en la identificación molecular de *S. aureus*. Extraídos de Martineau y col. (1998).

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Producto de amplificación (pb)
<i>Sa442-1</i>	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	108
<i>Sa442-2</i>	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA	108

Ta: Temperatura de unión específica o annealing; (*pb*): pares de bases.

Para la reacción de PCR se utilizó un termociclador TC-312 (Techne). Se colocaron aproximadamente 120 ng de ADN genómico como molde en un volumen total de 20 µl. Los reactivos utilizados en la mezcla de reacción y sus correspondientes concentraciones finales se detallan junto al programa de ciclado en las tablas 5 y 6. Como control positivo se utilizó la cepa Newbould 305 (ATCC 29740) de *S. aureus*. Para el control negativo se utilizó agua Milli-Q estéril.

Tabla 5. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación y sus concentraciones finales en un volumen final de 20 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer <i>Taq</i> 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	2,4 mM
dNTP's 25 mM	0,25 mM
Oligonucleótidos 20 µM	1 pM
<i>Taq</i> ADN Polimerasa 5U/µl	0,075 U/µl

Tabla 6. Etapas del programa de amplificación utilizado.

Etapa del ciclado	Condiciones
Desnaturalización inicial	96°C-3 min
	Desnaturalización 95°C-30 s
Amplificación (35 ciclos)	Hibridación 55°C-30 s
	Extensión 72°C-1 min
Extensión final	72°C-2 min

En cada caso se detalla la cantidad de ciclos como también la duración y la temperatura aplicada.

Los productos de PCR (10 µl) se sembraron en geles de agarosa (Invitrogen) al 3% en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato; 0,5 mM EDTA, pH 8,0) y el colorante de ácidos nucleicos Gel Red 1X (Biotium, CA, Estados Unidos). La corrida electroforética se realizó a 80 V durante 60 minutos en buffer TAE 1X. Paralelamente a las muestras, se sembró 1 µl del marcador de pb (Ladder 100 pb, PB-L Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina). Por último, las bandas fueron visualizadas al colocar el gel sobre un transiluminador UV (Labnet, Edison, Estados Unidos) y se tomaron fotografías usando una cámara digital (Olympus C-5060, Olympus America INC., Estados Unidos).

3.1.7 Evaluación de la presencia de genes de virulencia por PCR de punto final.

Con la finalidad de seleccionar 2 cepas de *S. aureus* con características genéticas diferenciales que pudieran asociarse con la capacidad de adaptación a la GM bovina, se evaluó mediante PCR de punto final la portación de genes relacionados con la expresión de los siguientes FV de *S. aureus*: polisacáridos capsulares (*cap5* y *cap8*), producción de *biofilm* (*agr*, *ica* y *bap*) y resistencia a los antibióticos beta-lactámicos (*blaZ*). La metodología se realizó según lo descripto en la bibliografía para los distintos genes de virulencia de *S. aureus*. Los pares de cebadores (*primers*) utilizados para la amplificación de las secuencias nucleotídicas de interés, así como el tamaño esperado del amplificado en pb se detallan en la tabla 2 del anexo 2. Como control negativo se utilizó agua DEPC 0,1%. Las condiciones usadas se resumieron en las tablas 7 a 16.

Tabla 7. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para los genes *cap5* y *cap8* y concentración final utilizada para un volumen total de 25 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer <i>Taq</i> 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,75 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM
Oligonucleótidos 20 µM	0,5 µM
<i>Taq</i> ADN Polimerasa 5U/µl	0,4 U/µl

Como controles positivos de referencia se utilizó ADN de las cepas de *S. aureus*: Reynolds para *cap5* y Becker para *cap8*.

Tabla 8. Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes *cap5* y *cap8*.

Etapa del ciclado		Condiciones
Desnaturalización inicial		94°C-5 min
	Desnaturalización	94°C-30 s
Amplificación (35 ciclos)		Hibridación 50°C-30 s
	Extensión	72°C-1 min
Extensión final		72°C-5 min

Se detalla la cantidad de ciclos, temperatura aplicada y duración en segundos (s) y minutos (min).

Tabla 9. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para los genes *agrI*, *agrII*, *agrIII* y *agrIV* y concentración final utilizada para un volumen total de 25 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer <i>Taq</i> 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,75 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM
Oligonucleótidos 20 µM	0,3 µM
<i>Taq</i> ADN Polimerasa 5U/µl	0,4 U/µl

Como controles positivos se utilizó ADN de las cepas de *S. aureus* de referencia para grupos *agr*: RN6390 para *agrI*, RN6607 para *agrII* y RN8540 para *agrIV* (Gilot y col., 2002. Para los genes *agr* se realizó una PCR multiplex donde se incluyeron en la mezcla de amplificación primers para cada uno de los cuatro tipos *agr*.

Tabla 10. Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes *agrI*, *agrII*, *agrIII* y *agrIV*.

Etapa del ciclado		Condiciones
Desnaturalización inicial		94°C-3 min
	Desnaturalización	94°C-30 s
Amplificación (26 ciclos)		Hibridación 55°C-30 s
	Extensión	72°C-60 s
Extensión final		72°C-10 min

Se detalla la cantidad de ciclos, la temperatura aplicada y duración en segundos (s) y minutos (min).

Tabla 11. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para los genes *icaA*, *icaC* e *icaD* y concentración final utilizada para un volumen total de 25 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer Taq 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,75 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM
Oligonucleótidos 20 µM	0,5 µM
Taq ADN Polymerasa 5U/µl	0,4 U/µl

El control positivo fue la cepa 17 de S. aureus caracterizada en la tesis doctoral de Pereyra (2015).

Tabla 12. Etapas del programa de amplificación utilizado para los genes *icaA*, *icaC* e *icaD*.

Etapas del ciclado		Condiciones
Desnaturalización		
inicial		96°C-3 min
	Desnaturalización	95°C-30 s
Amplificación	Hibridación	55°C-30 s
(32 ciclos)	Extensión	72°C-1min 30s
Extensión final		72°C-5 min

Se detalla la cantidad de ciclos, la temperatura aplicada y duración en segundos (s) y minutos (min).

Tabla 13. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para el gen *blaZ* y concentración final utilizada para un volumen total de 25 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer Taq 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,75 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM
Oligonucleótidos 0,4 µM	1 µM
Taq ADN Polymerasa 5U/µl	0,1 U/µl

Como control positivo se utilizó la cepa de referencia S. aureus ATCC 29213.

Tabla 14. Etapas del programa de amplificación utilizado para el gen *blaZ*.

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

Se detalla la cantidad de ciclos, la temperatura aplicada y la duración en segundos (s) y minutos (min).

Tabla 15. Reactivos incluidos en la mezcla de amplificación para el gen *bap* y concentración final utilizada para un volumen total de 25 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer Taq 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,75 mM
dNTP's 25 mM	0,2 mM
Oligonucleótidos 20 µM	0,5 µM
Taq ADN Polymerasa 5U/µl	0,4 U/µl

Como control positivo de referencia se utilizó ADN de la cepa de S. aureus V329 (Genbank accession N° AY220730.1), altamente formadora de biofilm. La cepa de S. aureus V329 fue gentilmente provista por el Dr. José Rafael Penadés de la Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia, España.

Tabla 16. Etapas del programa de amplificación utilizado para el gen *bap*.

Etapa del ciclado		Condiciones
Desnaturalización inicial		96°C-3 min
	Desnaturalización	95°C-30 s
Amplificación	Hibridación	60°C-45 s
(32 ciclos)	Extensión	72°C-30 s
Extensión final		72°C-5 min

Se detalla la cantidad de ciclos, la temperatura aplicada y la duración en segundos (s) y minutos (min).

Posteriormente, los productos de PCR (2,5 µl) fueron sembrados y corridos en gel de agarosa al 1 % para *bap*, al 1,5 % para *agrI-IV* y al 2 % para *cap5*, *cap8*, *icaACD* y *blaZ*, diluido en buffer TAE 1X y con el agregado del colorante de ácidos nucleicos Gel Red 1X.

3.1.8 Tipificación molecular por electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE).

Luego de la caracterización molecular por PCR se realizó la evaluación de la diversidad genética de las 34 cepas de *S. aureus* preseleccionadas mediante PFGE.

La realización de esta técnica consistió en tres fases: a) extracción del ADN cromosómico bacteriano, b) restricción del ADN utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y, c) separación de los fragmentos obtenidos mediante PFGE.

a) Extracción del ADN.

Las cepas de *S. aureus* fueron reactivadas según lo detallado en los apartados 3.1.1. y 3.1.2. Posteriormente, 1 ml del cultivo se centrifugó a 12.000 rpm por 2 min a 27 °C. El pellet bacteriano se resuspendió en 1000 µl de buffer PIV NaCl 1 M /Tris-HCl (pH 8) 10 mM. (Anexo 1), se centrifugó utilizando las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 200 µl de buffer PIV. Se tomaron 5 µl de esta suspensión bacteriana, se resuspendieron en 1000 µl de buffer PIV y se midió la DO a 620 nm. Este valor se utilizó para calcular el volumen de solución PIV (Δ) a agregar a la suspensión bacteriana para que todas las muestras alcancen una DO a 620 nm igual a 5 (DO₆₂₀=5). Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\Delta) \text{ Vol}_{\text{dil}} = (\text{DO}_{620} \times 40 \times 210) - 210$$

Posteriormente, se mezclaron partes iguales de la suspensión bacteriana con DO₆₂₀=5 y de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5%. Con micropipeta, se colocaron gotas de 20 µl de la mezcla sobre una superficie de vidrio. Se dejaron solidificar durante 5 min a -20°C y 10 min a temperatura ambiente. Luego, estas gotas de agarosa solidificadas se incubaron en buffer EC-Lisis (Anexo 1) a 37°C durante 5 hs y posteriormente en buffer ES-P (Anexo 1) a 50°C durante 18 hs. Por último, los bloques de agarosa se lavaron 6 veces durante 30 min con buffer Tris EDTA (Anexo 1).

b) Restricción del ADN.

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

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

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X (Anexo 1). En cada uno de los pocillos se colocaron los bloques de agarosa digeridos y el marcador de peso molecular. Los fragmentos de ADN fueron separados con un equipo CHEF DRIII System (BIO-RAD). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: distribución lineal de pulsos de 5 a 35 s, a 6 V/cm durante 23 hs. El alto voltaje usado fue necesario para lograr una adecuada separación de los fragmentos grandes de ADN, por ello el buffer de corrida debe recircular a través de un módulo de enfriamiento, lográndose así mantener su temperatura constante, ajustada a 11,3°C. Los geles fueron coloreados con 0,5 mg/l de bromuro de etidio (BrEt, Byodinamics) y el ADN visualizado con un transiluminador de UV. Los resultados se registraron con una cámara digital.

A partir de los perfiles de bandas obtenidos se siguió el criterio establecido por Tenover y col. (1995) comparando número, tamaño, ubicación o desaparición de los fragmentos para las distintas cepas. Se construyó un patrón de bandas que reúne todas las posiciones en que se presentaron los fragmentos y se determinó un valor numérico para cada aislamiento, calculado por la razón entre el número de bandas compartidas y las no compartidas. El número fue comparado para los 34 aislamientos y se representaron los resultados gráficamente y numéricamente evidenciando los pulsotipos de los aislamientos. El análisis se realizó con el programa Pyelph (Pavel y Vasile, 2012).

Las relaciones epidemiológicas entre los aislamientos se describieron gráficamente utilizando el programa para filogenia Treecon para Windows (Van de Peer y De Wachter, 1994). El mismo permite la construcción y el dibujo de árboles filogenéticos (dendrogramas) basados en distancias evolutivas calculadas desde las secuencias de ácidos nucleicos de cada cepa de *S. aureus*. Se definieron los pulsotipos considerando que los aislamientos que comparten un 80% de similitud en su patrón de bandas pertenecen al mismo subtipo.

La agrupación en pulsotipos permitió seleccionar 6 cepas de *S. aureus* con diferentes patrones clonales, 3 de las cuales fueron de baja adaptación a la GM o T (cepas 3, 179 y 806) y 3 de alta adaptación a la GM o P (cepas 5011, 5128 y 37).

3.1.9 Genotipificación de ADN basado en microarreglos (*Microarray-based DNA genotyping*).

Las 6 cepas de *S. aureus* seleccionadas mediante PFGE fueron posteriormente caracterizadas utilizando un sistema de genotipificación de ADN basado en microarreglos (*Alere GmbH, Jena, Germany*). Este procedimiento se realizó con la colaboración del Dr. Stefan Monecke en el *Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Technical* en la Universidad de Dresden, Alemania.

El ADN genómico fue obtenido como lo describió previamente Monecke y col. (2008). Las secuencias del microarreglo utilizado en este sistema fueron las secuencias del genoma de cepas de *S. aureus* publicadas por Monecke y col. (2008). El microarreglo abarca 334 secuencias diana correspondientes a 185 genes diferentes y sus variantes alélicas y detecta una amplia gama de determinantes genéticos incluyendo controles específicos de especie, genes que codifican factores de virulencia y resistencia, genes que codifican exotoxinas, superantígenos y MSCRAMM, así como marcadores de tipado como SCCmec, cápsula y grupo agr (Monecke y col., 2009). La interpretación de los datos, la definición del umbral y la categorización se realizaron como lo describen Monecke y col. (2008). Los resultados categorizados como ambiguos se contaron como negativos. Sobre la base de los patrones de hibridación y mediante la comparación con una base de datos de cepas de referencia, los aislados se asignaron a complejos clonales (CC) utilizando la nomenclatura basada en *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Monecke y col., 2008).

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

3.1.10 Cuantificación de la producción de *biofilm* mediante el método de cultivo en placa.

Con la finalidad de seleccionar 2 cepas de *S. aureus* con características fenotípicas diferenciales que pudieran asociarse con la capacidad de adaptación a la GM bovina, se evaluó la producción *biofilm* de las 34 cepas de *S. aureus* preseleccionadas utilizando el método descrito por Stepanovic y col. (2007) con modificaciones. Las cepas de *S. aureus* conservadas fueron reactivadas según lo detallado en los apartados 3.1.1. y 3.1.3. A partir

del cultivo líquido se realizó una dilución 1/100, mezclando 990 µl de TSC suplementado con 1% de glucosa (Laboratorios Cicarelli) y 10 µl del cultivo de cada cepa de *S. aureus* a evaluar. Doscientos µl de esta dilución se sembraron por triplicado en una placa de 96 pocillos de fondo plano (GBO). Este procedimiento se realizó para cada cepa de *S. aureus* a evaluar. Se incluyeron seis pocillos con 200 µl de CTS en cada placa como control negativo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 hs. Se descartó el líquido de la placa por volcado y se realizaron 3 lavados con 300 µl de PBS estéril 1X (pH 7.2). Luego del secado de la placa por inversión, se fijaron los pocillos con 150 µl de metanol (Laboratorios Cicarelli) durante 20 min. Posteriormente, se descartó el líquido por volcado y se incubó la placa a 27°C en posición invertida durante 16 hs. La tinción se realizó con 150 µl de una solución al 2% de cristal violeta (Britania) durante 15 min. Se realizaron 3 lavados con agua destilada y descarte por volcado. La decoloración se realizó añadiendo 150 µl de una solución de etanol 95% durante 30 minutos y finalmente se midió la DO a 570 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano BMG Labtech). El valor de DO se consideró proporcional a la formación de biomasa o cantidad de *biofilm*. Cada ensayo se repitió 3 veces y la cepa V329, cepa positiva para el gen *bap* y fuerte productora de *biofilm in vitro* se utilizó como control positivo. Los resultados se interpretaron de acuerdo con la metodología empleada por Li y col. (2012). El valor de DO de corte (DOc) se definió como el valor de la media del control negativo más tres desviaciones estándar por encima de la misma. En este estudio se obtuvo una DOc de 0,4 por lo que se clasificaron a los aislamientos de la siguiente forma (Tabla 17):

Tabla 17. Clasificación de la capacidad para formar *biofilm* según método de cultivo en placa. Adaptado de Li y col. (2012).

Consideración DO	Valor DO	Clasificación
DO < DOc	< 0,4	NP
DOc < DO < 2DOc	0,4-0,8	D
2DOc < DO < 4DOc	0,8-1,6	M
DO > 4DOc	> 1,6	F

DO: densidad óptica, DOc: densidad óptica de corte, NP: no productora, D: débil, M: moderada, F: fuerte.

3.1.11 Curvas de crecimiento de cepas de *S. aureus*.

Se evaluaron diferentes parámetros del crecimiento *in vitro* de 6 cepas de *S. aureus* seleccionadas en función a la portación de genes de virulencia de interés, genotipo, producción de *biofilm* y la capacidad de adaptación a la GM bovina (T o P). Además, se incluyeron en el ensayo la cepa V329 portadora del gen *bap* con alta capacidad para producir *biofilm* y la cepa Newbould 305 (ATCC 29740), cepa de referencia aislada de mastitis bovina ampliamente utilizada en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Hensen y col., 2000; Bannerman y col., 2004; Bouchard y col., 2012).

Las cepas de *S. aureus* fueron reactivadas según lo detallado en los apartados 3.1.1. y 3.1.4. A partir del cultivo líquido se realizó una dilución 1/100 para la cual se colocaron 240 µl/pocillo de CTS en una placa de 96 pocillos y se agregaron 2,4 µl del cultivo líquido correspondiente a cada cepa a evaluar. Se utilizó como control negativo CTS sin el agregado del cultivo de *S. aureus*. El crecimiento se determinó mediante lecturas de DO a 630nm cada 1 hora y durante 24 hs, utilizando el equipo Multi-Mode Microplate Reader, Synergy™ HT, Biotek. A partir del informe emitido por el equipo, se analizó la duración de la fase de crecimiento logarítmica (*lagtime*) de cada cepa y el tiempo en el que cada una de ellas alcanzó el máximo crecimiento (*t at Max V*). De cada cepa evaluada se realizaron triplicados en cada ensayo y el mismo se repitió 3 veces.

3.1.12 Determinación de número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitro.

Previo a los ensayos de internalización se realizó la determinación del número de UFC/ml de 6 cepas de *S. aureus* que se seleccionaron en función a la portación de genes de virulencia de interés, a su pulstotipo, secuenciotipo, producción de *biofilm* y capacidad de adaptación a la GM bovina (T o P). También se incluyó la cepa V329 por ser portadora del gen *bap*. La determinación del número de UFC/ml de cada cepa fue necesaria para calcular la relación bacteria:célula o multiplicidad de infección (MOI, *multiplicity of infection*) a utilizar en los ensayos de adherencia y/o internalización en la línea celular epitelial mamaria bovina, MAC-T (Huynh y col., 1991).

Para realizar esta determinación, las cepas de *S. aureus* fueron reactivadas según lo detallado en los apartados 3.1.1. y 3.1.4. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en base 10 del cultivo líquido y se sembraron en Agar Manitol Salado (AMS, Britania)

(Anexo 1). Brevemente, se colocaron 90 µl de buffer fosfato salino 1X (PBS) estéril (Anexo 1) en 8 pocillos de una placa de 96 pocillos y se realizaron las siguientes diluciones: 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁸. Luego, se sembraron 20 µl de cada dilución por duplicado en placas de AMS y se incubaron por 24 hs a 37°C. Finalmente, se contaron las colonias en la dilución correspondiente (conteniendo hasta un máximo de 30 o 40 colonias) para luego calcular el número de UFC/ml según la siguiente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ UFC/ml} = \text{N}^\circ \text{ colonias} \times 1 \times 10^{\text{X (dilución)}} \times 50$$

Se realizaron triplicados de cada dilución y el ensayo se repitió 3 veces para obtener el resultado final.

3.1.13 Recuento de UFC/ml en diferentes tiempos del crecimiento bacteriano.

Previo a la realización de los ensayos de internalización con las 6 cepas seleccionadas según los criterios descritos en el apartado 3.1, se evaluó si la capacidad de invasión de *S. aureus* a las células MAC-T se modificaba con la fase de crecimiento en la que se encontraban las bacterias al momento de realizar la infección, es decir si estaban en fase de crecimiento logarítmica o estacionaria. Para ello, se cuantificó el número de UFC/ml de dos cepas de *S. aureus* (179 T y 5011 P) a las 2 y 16 hs del crecimiento en cultivo líquido utilizando el método descrito en el apartado 3.1.12.

✧ Ensayos de internalización, adherencia, persistencia y muerte inducida por *S. aureus* en células MAC-T.

3.1.14 Cultivo de células MAC-T.

Se utilizó la línea celular MAC-T (Hyunh y col., 1991) proveniente de células epiteliales alveolares mamarias bovinas. Las mismas se cultivaron en frascos T de cultivo de 75 cm² con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios), 1 µg/ml de hidrocortisona (Richet), antibióticos penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Gibco) e insulina bovina (Betasing U-4000, pH 7,2-7,0). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se renovó cada 48 hs y las células se subcultivaron una vez por semana.

Para los ensayos de adherencia, invasión, persistencia y daño, las células MAC-T fueron cultivadas en placas de 24 pocillos (GBO) en 1000 μ l de medio completo y se dejaron crecer a confluencia durante 48 hs (1×10^5 cel/ml). Transcurrido el tiempo de incubación, las células MAC-T (aproximadamente $2,5 \times 10^5$ cel/ml) se utilizaron para los diferentes ensayos que se describen a continuación.

3.1.15 Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmica y estacionaria en células MAC-T.

Se realizaron ensayos de invasión en células MAC-T utilizando dos cepas de *S. aureus*, una de alta adaptación a la GM o P (5011) y otra de baja adaptación a la GM o T (179), ambas cepas se utilizaron en dos fases de crecimiento: logarítmica (2 hs de crecimiento en TSC) y estacionaria (16 hs de crecimiento en TSC), para evaluar si existían diferencias en la capacidad de cada cepa de invadir a las células MAC-T según la fase de crecimiento en la que se encontraban. Las cepas de *S. aureus* fueron reactivadas según lo explicado en los apartados 3.1.1. y 3.1.2.

A partir del cultivo líquido de 16 hs de ambas cepas (correspondiente a la fase de crecimiento estacionaria), se realizó cultivo líquido de 2 hs (correspondiente a la fase de crecimiento logarítmica) según lo detallado en el apartado 3.1.4.

Posteriormente, las 2 suspensiones de cada cepa seleccionada fueron co-cultivadas con una monocapa confluyente de células MAC-T en medio D-MEM (Apartado 3.1.14) en una MOI, de 100 bacterias/célula MAC-T durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El número de células MAC-T por pocillo fue estimado mediante recuento en cámara de Neubauer para calcular la cantidad de *S. aureus* necesaria para obtener, en cada condición, una MOI de 100. Paralelamente, se sembraron estos inóculos iniciales (ii) por triplicado en placas de AMS para corroborar el número de UFC/ml que se pusieron en contacto con las células MAC-T. En la Figura 6 se muestran MAC-T en confluencia antes de la infección e infectadas con *S. aureus*.

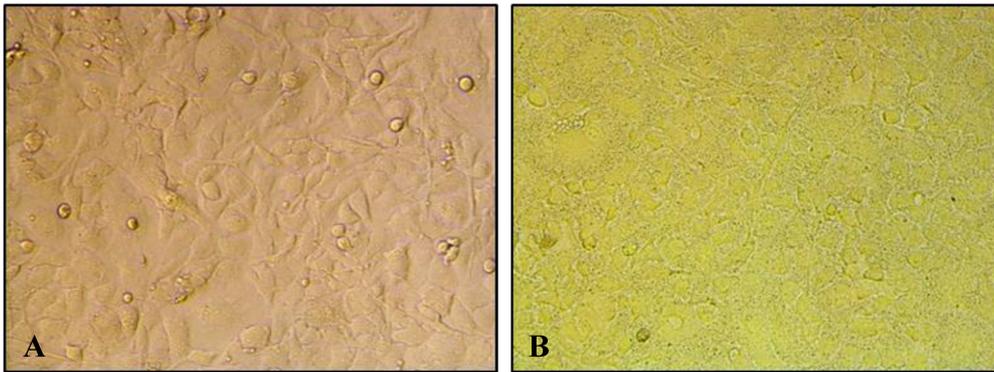


Figura 6. **A.** MAC-T en confluencia con morfología normal pre-infección. **B.** MAC-T infectadas con *S. aureus*. Se observa un puntillado negro correspondiente a las bacterias sobre las MAC-T en confluencia.

Al finalizar la incubación se lavaron las monocapas de células MAC-T 3 veces con 500 μ l de PBS 1X (por lavado) y se incubaron con 1,5 ml de medio DMEM/RPMI suplementado con 300 μ g/ml de gentamicina (OVER) durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂ con la finalidad de eliminar las bacterias extracelulares o no internalizadas. Finalizada la incubación, se colectaron los sobrenadantes y se sembraron en placas AMS para verificar la muerte bacteriana por gentamicina. Por último, las monocapas de células MAC-T fueron lavadas 2 veces con 500 μ l de PBS 1X y tratadas con Tritón X-100 (Amerham) en una concentración final de 0,025% (v/v) en agua destilada estéril. La placa se incubó en agitación a 150 rpm, durante 10 min a temperatura ambiente, para favorecer la lisis de las células y la liberación de las bacterias intracelulares. Luego, se recolectó el lisado de las MAC-T conteniendo las bacterias internalizadas. Las UFC/ml de *S. aureus* recuperadas del interior de las células MAC-T fueron determinadas mediante la técnica de recuento en placa según lo explicado en el apartado 3.1.12 sembrándose las diluciones 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.

Se realizaron triplicados para cada cepa evaluada en cada ensayo, y se llevaron a cabo 3 réplicas del ensayo para obtener el resultado final de UFC internalizadas para cada cepa y en cada fase de crecimiento (16 y 2 hs). A partir del recuento de las UFC se realizaron los siguientes cálculos:

- Se corroboró la MOI real con la cual se infectaron las células MAC-T:

$$\text{MOI real} = \frac{\text{ii}}{\text{células por pocillo}}$$

De esta manera, se pudo comprobar que el número de UFC utilizadas para la infección de las MAC-T fue el deseado. Además, se determinó número de UFC que se recuperaron del interior de las células MAC-T, según lo explicado en el punto 3.1.12.

3.1.16 Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de *S. aureus* en células MAC-T.

Se evaluó la capacidad de internalización en células MAC-T de 7 cepas de *S. aureus* seleccionadas en función de su genotipo, fenotipo y adaptación a la GM bovina. Se emplearon 3 aislados de *S. aureus* de baja adaptación a la GM o T (3, 179 y 806) y 3 aislados de *S. aureus* de alta adaptación a la GM o P (5011, 5128 y 37). Además, se incluyó la cepa de *S. aureus* V329, portadora del gen *bap* y fuerte formadora de *biofilm*. La tabla 3 (Anexo 2) muestra las características diferenciales de las cepas seleccionadas para los ensayos de internalización. Como control negativo se empleó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , la cual es incapaz de invadir a las células epiteliales mamarias bovinas.

El ensayo se realizó con la misma metodología empleada en el apartado 3.1.15. Como ii de estos ensayos se utilizaron cultivos líquidos de *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmica (2 hs de crecimiento) según lo detallado en el apartado 3.1.4. De cada cepa evaluada se hicieron triplicados en cada ensayo y el ensayo se repitió 3 veces para obtener 3 réplicas.

3.1.17 Evaluación de la capacidad de adherencia de cepas de *S. aureus* en células MAC-T.

Luego de los ensayos de internalización con las 7 cepas mencionadas, se seleccionaron 2 cepas de *S. aureus* con características diferenciales en relación a la portación de genes de virulencia (*cap*, *ica*, *agr*, *bap*, *blaZ*), producción de *biofilm* (débil o fuerte), pulsotipo (PFGE), perfil clonal (*microarrays* de ADN), capacidad de adaptación a la GM bovina (T o P) y capacidad de internalización a las células MAC-T (alta o baja). En la Tabla 4 (Anexo 2) se detallan las características diferenciales de las 2 cepas de *S. aureus* seleccionadas (806 T y 5011 P). Las mismas se emplearon en los ensayos de adherencia que se describen en este apartado y de persistencia intracelular que se describen en el siguiente.

El ensayo de adherencia se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.15 con algunas modificaciones. Como ii de estos ensayos se utilizaron cultivos líquidos de *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmica según lo detallado en el apartado 3.1.4. Brevemente, monocapas de células MAC-T fueron co-cultivadas con las suspensiones de *S. aureus* utilizando una MOI de 100, durante 2 hs a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente, las monocapas fueron lavadas tres veces con 500 µl de PBS 1X estéril y se procedió a la lisis de las células MAC-T según el procedimiento del ensayo estándar. Se realizaron diluciones seriadas, siembra en AMS y posterior recuento de UFC.

3.1.18 Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* de persistir en células MAC-T.

El objetivo de los ensayos de persistencia fue evaluar la habilidad de las 2 cepas de *S. aureus* seleccionadas según los criterios mencionados anteriormente, para sobrevivir intracelularmente en las células MAC-T durante 4, 10, 24, 48 y 72 hs.

Se realizaron ensayos previos con diferentes MOIs (10, 30 y 100) para determinar la más apropiada a utilizar para la infección persistente de las células MAC-T. Cuando se infectaron monocapas de células MACT utilizando una MOI de 100 durante 72 hs, se observó una disminución de la viabilidad de las células epiteliales y una mayor variabilidad de los resultados entre ensayos. La misma variabilidad se observó cuando se infectaron a las células MACT utilizando una MOI de 10 bacterias por células. La MOI de 30 indujo un daño moderado a las células MAC-T y la infección pudo establecerse en el tiempo hasta las 72 hs pi, por lo tanto, fue la MOI seleccionada para los ensayos con las 7 cepas de *S. aureus*.

La primera parte del ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.16, que corresponde al ensayo de internalización estándar. Finalizadas las 2 hs de incubación de las células MAC-T con el medio conteniendo gentamicina, las monocapas celulares se lavaron 2 veces con 500 µl de PBS 1X y a los pocillos que correspondían a las 4 hs de infección se les agregó Tritón al 0,025% (v/v) en agua destilada estéril y se continuó con el ensayo estándar. A los pocillos que correspondían a los tiempos de 10, 24, 48 y 72 hs de infección se les reemplazo el medio de cultivo y se agregó medio completo suplementado con 300 µg/ml de gentamicina (Anexo 1) para evitar las re-infecciones de la monocapa por las bacterias que se liberan al morir las células infectadas y se incubó a 37°C con 5% CO₂. Al cumplirse el tiempo de incubación

correspondiente, se procedió a la lisis de las células MAC-T y posterior siembra en placas de AMS, siguiendo el mismo procedimiento que para el ensayo estándar.

3.1.19 Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* para inducir muerte en células MAC-T.

Para la realización de este ensayo se utilizó el kit comercial: Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam) y la muerte celular se evaluó por citometría de flujo. El fundamento de esta técnica está basado en la translocación de la fosfatidilserina (PS) desde la cara interna de la membrana celular a la superficie externa de la misma, ello ocurre cuando la célula inicia el proceso de apoptosis. Una vez en la superficie, la PS puede ser fácilmente detectada por Anexina V, una proteína que tiene alta afinidad por ella. La Anexina V se encuentra conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), por lo cual permite la detección de células en apoptosis temprana mediante citometría de flujo. Por otra parte, en apoptosis tardía y/o necrosis, la integridad de la membrana plasmática y nuclear disminuye, permitiendo que el yoduro de propidio (IP) ingrese a la célula, se intercale entre los ácidos nucleicos, y aumente su fluorescencia unas 20 a 30 veces (Faleiro y Lazebnik, 2000; Vermes y col., 1995; Vermes y col., 2000).

El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.18 (ensayo de persistencia). Durante el co-cultivo, a los pocillos de células MAC-T infectadas con las cepas de *S. aureus* (24, 48 y 72 hs), se les renovó el medio de cultivo cada 24 hs suplementado con gentamicina a los fines de evitar una reinfección de la monocapa por las bacterias liberadas al morir las células.

Al cumplirse las 4, 24, 48 y 72 hs de incubación de las MAC-T con las cepas de *S. aureus*, las monocapas celulares se lavaron 2 veces con 500 µl de PBS 1X, se les agregó 200 µl de tripsina-EDTA 1X (Emeve Medios) y se incubaron a 37°C por 8-10 min hasta que las células MAC-T se despegaron de la superficie del pocillo. Se detuvo la acción de la tripsina con 1000 µl de medio completo de las MAC-T (Anexo 1), se colectaron las células en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 µl de *Binding Buffer* (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit) a cada tubo más 5 µl de Anexina V-FITC y/o 5 µl de IP según el tubo que correspondiera y se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad por 5 min. Finalmente, las células fueron adquiridas en el citómetro de flujo Attune NxT (Acoustic Focusing Cytometer A24860, Thermo Fisher SCIENTIFIC).

Los controles utilizados en este ensayo fueron los siguientes:

- a) Un control de células sin infectar y sin marcar (doble negativo) para determinar el nivel basal de fluorescencia de las MAC-T.
- b) Un control de muerte basal de las células MAC-T. La marcación se realizó con 5 μ l de AnexinaV-FITC y 5 μ l de IP.
- c) Un control positivo de necrosis. Las células fueron tratadas con 150 μ l de alcohol etílico absoluto 99.5% (Laboratorios Cicarelli) por 3 hs. La marcación se realizó con 5 μ l de IP.
- d) Un control positivo de apoptosis. Las células fueron tratadas con 10 μ l de peróxido de hidrógeno por 7 hs. La marcación se realizó con 5 μ l de Anexina V-FITC.

El análisis de los datos de citometría de flujo se basa en el principio de “gating”. Los “gate” y las regiones se colocaron alrededor de poblaciones de células con características comunes, para investigar y cuantificar estas poblaciones de interés. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando un software específico (FlowJo, TreeStar Inc., Ashland, EE. UU) y se evaluó el porcentaje de células Anexina V simple positivas (correspondiente a células en apoptosis temprana), células Anexina V positivas, IP positivas (dobles positivas, correspondiente a células en apoptosis tardía y/o necrosis) y células IP simples positivas (correspondiente a células muertas por necrosis). De cada cepa evaluada se hicieron duplicados en cada ensayo y el ensayo se llevó a cabo 3 veces para obtener 3 réplicas del mismo.

3.1.20 Evaluación de la viabilidad de células MAC-T luego del co-cultivo con cepas de *S. aureus*.

El objetivo de estos ensayos fue evaluar la viabilidad de las células MAC-T luego de 4, 24, 48 y 72 hs del co-cultivo con las 2 cepas de *S. aureus* seleccionadas para los ensayos de persistencia, 806 (T) y 5011 (P).

Se realizó un ensayo colorimétrico para la determinación por cuantificación no radioactiva de la viabilidad celular. El ensayo está basado en el clivaje de la sal de tetrazolio (XTT) y su conversión a formazan (de color naranja), debido al metabolismo celular activo (Gerlier y Thomasset, 1986), por lo tanto, esta conversión solo ocurre en células viables. El formazan formado es soluble en soluciones acuosas y se cuantifica directamente midiendo DO en un espectrofotómetro. Para la realización de este ensayo

se utilizó el kit comercial: Cell Proliferation Kit II (XTT) (ROCHE) y el equipo utilizado para la medición de la reacción fue el SPECTROstar Nano (BMG LABTECH).

Se realizó el ensayo siguiendo la metodología descrita en el ensayo de persistencia (apartado 3.1.16). Durante el co-cultivo, a los pocillos de células MAC-T infectadas con las cepas de *S. aureus* (24, 48 y 72 hs), se les renovó el medio de cultivo suplementado con gentamicina cada 24 hs a los fines de evitar una reinfección de la monocapa por las bacterias liberadas al morir las células. Al cumplirse las 4, 24, 48 y 72 hs de incubación de las células MAC-T con las cepas de *S. aureus*, se lavaron las monocapas celulares 2 veces con 500 µl de PBS 1X y se agregó 1 ml de medio completo MAC-T suplementado con gentamicina (Anexo 1) más el agregado de 500 µl de una mezcla de XTT labeling reagent (1 mg/ml) y Electron-coupling reagent (0,3 mg/ml), y se incubó por 2 hs a 37°C. Finalmente, se colectó el sobrenadante de cada pocillo y se midió la DO a 470 nm utilizando el equipo SPECTROstar Nano.

Los controles utilizados para este ensayo fueron los siguientes:

- a) Un control de sobrenadante de células sin infectar y sin XXT, blanco de la medición para cada tiempo.
- b) Un control de células muertas para cada tiempo. Las células fueron tratadas con 150 µl de alcohol etílico absoluto 99.5% (Laboratorios Cicarelli) por 3 hs y posteriormente con el kit XTT.
- c) Un control de células vivas sin infectar. Las células fueron tratadas con el kit XTT de la misma manera que las infectadas.

3.1.21 Evaluación de la viabilidad intracelular de cepas de *S. aureus* en células MAC-T.

El objetivo de este ensayo fue evaluar la viabilidad intracelular de las dos cepas de *S. aureus* seleccionadas, 806 (T) y 5011 (P), luego de 4, 10, 24, 48 y 72 hs del co-cultivo con las células MAC-T.

Para la realización de este ensayo se utilizó el kit comercial: Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen) y el equipo utilizado fue el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ci.

Para este ensayo, células MAC-T se sembraron sobre cubreobjetos estériles colocados en los pocillos de una placa de cultivo y se realizó el ensayo de persistencia con la misma metodología empleada en apartado 3.1.16. Al cumplirse las 4, 10, 24, 48 y 72 hs de incubación de las células MAC-T con las cepas de *S. aureus*, se lavó la monocapa

3 veces con 1 ml de PBS 1X, se levantó el cubreobjetos con las células MAC-T crecidas en su superficie y se colocó sobre un portaobjetos. Se agregaron 300 µl del reactivo A (fijador, kit Leucoperm™, BIORAD) por 15 min, y luego de lavar con 500 µl de PBS 1X se incubó a las células MAC-T con saponina (SIGMA-ALDRICH) al 0,1% por 10 min para permeabilizar la membrana celular. Posteriormente, se agregaron 500 µl de una mezcla de Syto 9 (0,5 µl, 3.34 mM) e IP (1 µl, 20 mM) en saponina al 0,1% y se incubó en oscuridad por 30 min. Finalmente, luego de lavar a la monocapa de células MAC-T con PBS 1X, se agregó una gota de líquido de montaje (Kit Live/Dead®) y se observó en el microscopio de fluorescencia a 40X y 100X utilizando los filtros correspondientes.

Para cumplir con el **objetivo específico 2.2.2** de la presente tesis se realizaron los ensayos comprendidos en los ítems del punto 3.2.

3.2 Ensayo de fagocitosis, persistencia y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en macrófagos infectados con cepas de *S. aureus* marcadas con FITC.

El objetivo de estos ensayos fue evaluar y comparar la actividad fagocítica de macrófagos bovinos provenientes de secreciones de glándulas mamarias en involución y enfrentados a las cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas seleccionadas en función de su genotipo, fenotipo, adaptación a la GM (T o P) y capacidad invasiva en las células MAC-T.

3.2.1 Toma de muestras de secreción mamaria.

Para la realización de estos ensayos se tomaron muestras de secreción mamaria provenientes de cuartos sanos de vacas Holando Argentino a los 10-15 días luego de la finalización de la lactancia (pos-secado). Previo a la toma de muestra se realizaron 3 muestreos consecutivos cada 7 días para descartar la presencia de IIM a través de cultivos microbiológicos. Los animales utilizados para el muestreo pertenecían al tambo de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja de la Universidad Nacional del Litoral.

Para los cultivos bacteriológicos se obtuvieron 10 ml de secreción mamaria en forma aséptica en tubos estériles. Para el aislamiento y purificación de macrófagos se obtuvieron 100 ml de secreción mamaria de cada cuarto en forma aséptica (Figura 7). Las muestras fueron conservadas a 4°C e inmediatamente remitidas al laboratorio.



Figura 7. A. Muestras para cultivo microbiológico. B. Muestras de secreción mamaria para aislamiento y purificación de macrófagos.

3.2.2 Marcación de las cepas de *S. aureus* con FITC.

Se realizó la marcación de las 2 cepas de *S. aureus* seleccionadas, 806 (T) y 5011 (P), con FITC (SIGMA-ALDRICH) siguiendo la metodología descrita por Renna y col. (2014). Las cepas de *S. aureus* conservadas fueron reactivadas según lo explicado en los apartados 3.1.1. y 3.1.3, con la única diferencia que el cultivo líquido se incubó durante 16 hs y a 150 rpm de agitación. Una alícuota del cultivo líquido se destinó para realizar las diluciones correspondientes y corroborar el número de UFC/ml según lo detallado en el apartado 3.1.12. El resto del cultivo líquido se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet bacteriano en 990 μ l de PBS 1X y se agregaron 10 μ l de la solución de FITC / Dimetil sulfoxido (DMSO, SIGMA-ALDRICH). La suspensión se incubó durante 1 h a 37°C en agitación suave. Luego, se agregó PBS 1X hasta completar 10 ml de volumen final y se centrifugó por 5 min a 10.000 rpm. El pellet bacteriano se lavó una vez más con PBS y finalmente se almacenó a -4°C hasta su uso. La eficiencia de la marcación con FITC se evaluó por citometría de flujo, utilizando el equipo Attune NxT y se consideró aceptable cuando el 95-100% de las bacterias fueron positivas para FITC.

3.2.3 Purificación de macrófagos de secreción mamaria de vaca seca.

Los macrófagos fueron purificados siguiendo la metodología previamente descrita por Beccaria y col. (2018). Brevemente, las muestras se diluyeron al medio con PBS 1X estéril y se centrifugaron a 1890 x rpm por 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se lavó dos

veces y se resuspendió en 40 ml de PBS estéril. Se agregaron en el fondo del tubo 5 ml de Ficoll-Paque™ PLUS (densidad 1083, GE Healthcare) y se centrifugó a 1890 rpm, por 30 min a temperatura ambiente. Las células mononucleares se obtuvieron de la separación de las dos fases entre la solución de Ficoll y la suspensión que contenía a las células. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y se evaluó la viabilidad celular con solución de azul de tripán 0.4% (Gibco) para posteriormente ser utilizadas para los ensayos que se describen a continuación.

3.2.4 Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* de inducir actividad fagocítica y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos.

Los macrófagos purificados de secreción mamaria de cuartos sanos fueron enfrentados a las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* marcadas con FITC siguiendo la metodología empleada por Renna y col. (2014) con modificaciones. Brevemente, se enfrentaron 100 µl de una suspensión de las cepas T y P de *S. aureus* (1×10^8 UFC/ml) con 100 µl de una suspensión de macrófagos purificados de secreción mamaria bovina (1×10^7 cél/ml), durante 30 min a 37°C en agitación suave. La MOI empleada fue de 100 bacterias por célula. La fagocitosis se detuvo mediante la adición de NaCl 0,85% / EDTA 0,04% a 4 °C. Luego, los macrófagos fueron incubados con hidroetidina 1 µM (HE, Molecular Probes, Invitrogen) en PBS durante 15 min a 37°C en oscuridad a los fines de evaluar la producción de ROS. La hidroetidina (HE) es un compuesto no fluorescente que difunde al interior de la célula y es convertido a bromuro de etidio por la presencia de ROS (principalmente por el anión superóxido) de manera dosis dependiente, dando como resultado final, la emisión de fluorescencia. Luego de la incubación con HE, las células se centrifugaron a 1890 rpm durante 5 min, se resuspendieron en fluido de enfoque (Attune® Focusing Fluid, ThermoFisher SCIENTIFIC) y se adquirieron en el citómetro de flujo Attune NxT. Una alícuota de los macrófagos purificados se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-CD14-APC (APC anti-CD14 human BioLegend®, CA, EEUU) en buffer de tinción (PBS-EDTA-FCS) a 4°C durante 30 min en oscuridad. Las células se lavaron, se resuspendieron en fluido de enfoque y se adquirieron en el equipo Attune NxT.

Se seleccionó la región R1 que contenía a la población de células mononucleares teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Forward Scatter*) y complejidad citoplasmática (*Side Scatter*). La población de macrófagos se identificó como CD14

positiva. El análisis de datos se realizó utilizando el programa FlowJo. Se evaluó el porcentaje de macrófagos con bacterias asociadas (adheridas y/o internalizadas, R2) y se utilizó la intensidad de fluorescencia media (IFM) para estimar el número de bacterias asociadas por célula positiva (Zetterlund y col., 1998; Renna y col., 2014). Se analizó, además, la conversión de HE a bromuro de etidio por la presencia de anión superóxido en la población de macrófagos totales (R1) y en la población de macrófagos positivos para FITC (R2), utilizándose el parámetro de IFM para estimar la cantidad de ROS producido por célula.

3.2.5 Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* de inducir la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos.

Para evaluar la producción de ON por los macrófagos de secreción mamaria enfrentados a las cepas de *S. aureus*, se utilizaron los sobrenadantes recuperados de los ensayos de fagocitosis (apartado 3.2.5), los cuales fueron filtrados utilizando un filtro de 0,22 μM (Milipore) para eliminar a las bacterias. La concentración de nitritos se determinó por el método de microplaca utilizando el kit de Griess (Griess Reagent Kit for Nitrite Determination, Molecular Probes) y siguiendo la metodología de Renna y col. (2019). Brevemente, en una placa de 96 pocillos se colocaron 150 μl del sobrenadante, se agregaron 150 μl del reactivo de Griess y se incubó por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 550 nm utilizando el equipo SPECTROstar^{Nano} (BMG LABTECH). La concentración de nitritos se calculó por medio de la utilización de un estándar de nitrito (nitrito de sodio, provisto por el kit), lo que permitió realizar una curva de calibración abarcando rangos de concentración entre 0,78 y 100 μM . Como control positivo de la producción de ON se utilizó la estimulación de los macrófagos de secreción mamaria por la combinación de activadores de la Proteína Kinasa C, como el acetato mirístico de forbol (PMA, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) (50 ng/ml, SIGMA-ALDRICH) asociados a Ionóforo de calcio como Ionomicina (Io, 1 μg -ml, SIGMA-ALDRICH).

3.2.6 Evaluación de la persistencia intracelular de cepas de *S. aureus* en macrófagos.

Se purificaron macrófagos de secreción mamaria bovina según lo explicado en el apartado 3.2.3. Se sembraron 2×10^6 cél/pocillo en una placa de 24 pocillos pretratada

con 300 µl de suero fetal bovino (SFB, Internegocios) durante 30 min y se incubaron durante 2 hs a 37°C 5% CO₂. Se cambió el medio de cultivo y se dejaron las células incubando en medio sin antibiótico por 16 hs (Anexo 1) hasta el momento de la infección con las dos cepas de *S. aureus*, las cuales fueron reactivadas según lo explicado en los apartados 3.1.1. y 3.1.2. A partir del cultivo líquido de 16 hs de ambas cepas, se realizó cultivo líquido de 2 hs según lo detallado en el apartado 3.1.4. Posteriormente, las suspensiones de cada cepa fueron co-cultivadas con los macrófagos en una MOI de 100 bacterias por célula en medio RPMI durante 1 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. El número de macrófagos por pocillo fue estimado mediante recuento en cámara de Neubauer para calcular la cantidad de *S. aureus* necesaria para obtener, en cada condición, una MOI de 100. La elección de esta MOI resulta de ensayos previos donde se evaluaron diferentes MOIs: 10, 30 y 100. La MOI de 100 UFC/célula fue elegida ya que los resultados obtenidos en los ensayos previos fueron más homogéneos y reproducibles en comparación con las MOIs de 10 y 30 donde se observó mayor variación en los resultados inter-ensayo. Paralelamente, se sembraron los ii por triplicado en placas de AMS para conocer cuántas UFC/ml fueron las que inicialmente se pusieron en contacto con las células.

Al finalizar la incubación, previo descarte del medio conteniendo las bacterias, se colocó 1 ml del medio RPMI suplementado con 300 µg/ml de gentamicina (OVER) a cada pocillo y se incubó por 1 h a 37°C con 5% CO₂ con la finalidad de eliminar las bacterias extracelulares. Finalizada la incubación, se colectaron los sobrenadantes y se sembraron en placas de AMS para verificar la muerte bacteriana por gentamicina. Por último, los macrófagos fueron lavados con 500 µl de PBS 1X y a los pocillos correspondientes a las 2 hs post-infección se les colocó 900 µl de Tritón X-100 al 0.025% v/v en agua destilada estéril y se incubó durante 10 min para favorecer la lisis de las células y la liberación de las bacterias intracelulares. Se recolectó el lisado celular y se realizaron diluciones seriadas en base 10 según lo explicado en el apartado 3.7. Se sembraron las diluciones 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000 para determinar las UFC intracelulares, las placas se incubaron 24 hs a 37°C y finalmente se realizó el recuento de las UFC. A los pocillos que correspondieron a los tiempos de 4, 8 y 24 hs de infección, se les agregó medio completo suplementado con 300 µg/ml de gentamicina y se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Al cumplirse el tiempo de incubación correspondiente, se procedió a la lisis de los macrófagos siguiendo el mismo protocolo que para las 2 hs de incubación.

De cada cepa evaluada se hicieron duplicados en cada ensayo y el ensayo se llevó a cabo 3 veces para obtener 3 réplicas del mismo.

3.2.7 Evaluación de la viabilidad intracelular de cepas de *S. aureus* en macrófagos.

Para la realización de este ensayo se utilizó el kit comercial: Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen) siguiendo instrucciones del fabricante. Brevemente, los macrófagos se sembraron sobre cubreobjetos estériles (previamente pretratados con SFB al 10%) colocados en los pocillos de una placa de cultivo y se realizó el ensayo de persistencia con la misma metodología empleada en el apartado 3.1.20. Al cumplirse las 2 y 4 hs de incubación de los macrófagos con las cepas de *S. aureus*, se lavó la monocapa 3 veces con 1 ml de PBS 1X, se levantó el cubreobjetos con los macrófagos crecidos en su superficie y se colocó sobre un portaobjetos. Para la marcación de las bacterias intracelulares se realizó el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.1.20. La observación de las bacterias intracelulares se realizó con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ci, utilizando los filtros correspondientes.

Para cumplir con el **objetivo específico 2.2.3** se realizaron los ensayos comprendidos en los ítems del punto 3.3.

3.3 Puesta a punto del modelo de infección experimental en la glándula mamaria bovina.

3.3.1 Preparación del inóculo para la infección intramamaria con las cepas T y P de *S. aureus*.

Los inóculos utilizados para infectar los cuartos mamarios se prepararon siguiendo el protocolo indicado a continuación: las dos cepas de *S. aureus* previamente seleccionadas a partir de los ensayos *in vitro* (apartados 3.1 y 3.2) fueron reactivadas según lo explicado en los apartados 3.1.1. y 3.1.3. A partir del cultivo líquido de 16 hs de ambas cepas, se realizó cultivo líquido de 2 hs según lo detallado en el apartado 3.1.4 y se realizaron las diluciones correspondientes en solución fisiológica para alcanzar una concentración aproximada de 250 UFC/ml de cada cepa.

3.3.2 Prueba de la infección intramamaria experimental.

Para la puesta a punto del modelo de infección intramamaria se utilizaron 4 vacas Holando argentino en el tercio final de la lactancia, con una producción promedio de 12-15 litros, pertenecientes al rodeo experimental de la EEA Rafaela (INTA). Se incluyeron animales de segunda o tercera lactancia y fueron seleccionados sobre la base de ausencia de IIM por patógenos mayores y menores de la ubre, de acuerdo con procedimientos estándares (Oliver y col., 2004). Para ello se tomaron muestras de leche de los cuatro cuartos mamarios (21, 14 y 7 días previos al desafío) y a las 48 hs antes del desafío experimental para cultivo microbiológico y RCS.

Para el examen bacteriológico se sembraron 10 µl de secreción mamaria en placas de agar-sangre (5%), incubándose por 48 hs en forma aeróbica. Las placas fueron examinadas a las 24 y 48 hs para detectar desarrollo bacteriano. Las colonias aisladas fueron identificadas de acuerdo con procedimientos estándares (Oliver y col., 2004). Los RCS se realizaron a través de un contador automático de células (Somacount 300, Bentley Instruments-Estados unidos) en el laboratorio de la Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero (Alecol).

A partir de los resultados obtenidos de los tres muestreos consecutivos se seleccionaron 2 animales con RCS no superiores a 200.000 cél/ml y cultivo microbiológico negativo. Los 2 animales restantes fueron excluidos del ensayo porque, si bien el cultivo microbiológico en los sucesivos muestreos fue negativo, los RCS obtenidos a partir de leche de los cuatro cuartos fueron superiores a 200.000 cél/ml.

3.3.3 Inoculación intramamaria

De los dos animales seleccionados, uno fue inoculado con 1 ml de solución fisiológica estéril en el cuarto anterior derecho (AD) (cuarto control) y el otro animal fue inoculado con 1 ml de las suspensiones de las cepas T (806) y P (5011) de *S. aureus* (250 UFC aproximadamente). El cuarto AD fue inoculado con la suspensión de la cepa T y el cuarto posterior izquierdo (PI) con la suspensión de la cepa P. La inoculación se realizó luego del ordeño de la tarde de la siguiente forma: se desinfectó la punta del pezón vigorosamente con un algodón embebido en alcohol (70%) y se empleó una jeringa acoplada a una cánula estéril, la cual se introdujo parcialmente en el canal del pezón para descargar el contenido. El líquido depositado en la cisterna del pezón fue desplazado

hacia la cisterna de la glándula, masajeando suavemente la base del pezón en dirección dorsal. Después de la inoculación el pezón fue sumergido en una solución antiséptica conteniendo 0,5% de iodo disponible.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas correspondientes sobre experimentación animal (*Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching. Federation of Animal Science Societies. Third edition. 2010. ISBN: 978-1-884706-11-0*) y sometidos a la aprobación del Comité de Ética y Seguridad de la FCV-UNL.

3.3.4 Monitoreo de la evolución de la infección

Los animales fueron monitoreados durante los primeros 5 días post-inoculación registrándose el estado general, presencia de inflamación en la glándula mamaria, apariencia macroscópica de la leche, apetito y producción de leche. Asimismo, se tomaron muestras de leche de los cuartos mamaros inoculados con las cepas de *S. aureus* y solución fisiológica (control negativo) a la hora 0 (pre-inoculación) y a las 12, 24, 48, 72, 96 y 120 hs post-inoculación para RCS y cultivo microbiológico según se detalló en el punto 3.3.2.

Para cumplir con el **objetivo específico 2.2.4** se realizaron los ensayos comprendidos en los ítems del punto 3.4.

3.4 Infección experimental de la glándula mamaria bovina con cepas T y P de *S. aureus*.

3.4.1 Preparación del inóculo para la infección intramamaria.

Se preparó la suspensión de cada cepa para ser inoculada en la GM bovina utilizando el protocolo descrito en el apartado 3.3.1. Se colocó 1 ml del inóculo estéril (conteniendo aproximadamente 250 UFC) en jeringas con una cánula intramamaria acoplada y se mantuvieron refrigerados a 4°C hasta su utilización. Simultáneamente, se prepararon jeringas con 1 ml de solución fisiológica estéril para inocular en los cuartos controles.

3.4.2 Selección de los animales

Para los desafíos experimentales se seleccionaron 9 vacas en el tercio final de la lactancia, pertenecientes al tambo de la Escuela de Agricultura Ganadería y Granja (UNL). Los criterios para la selección de los animales fueron los mismos que se detallaron en el punto 3.3.2. De los 9 animales inicialmente seleccionados, 3 fueron excluidos del ensayo ya que los RCS a partir de leche de los cuatro cuartos fueron superiores a 200.000 cél/ml en el último muestreo realizado la semana previa al desafío experimental.

3.4.3 Desafío experimental: infección intramamaria con cepas T y P de *S. aureus*.

En el diseño experimental se incluyeron 6 animales, de los cuales 1 fue inoculado en los cuartos contralaterales (AD y PI) con 1 ml de la suspensión conteniendo la cepa T (806) de *S. aureus* (250 UFC), 2 animales fueron inoculados en los cuartos contralaterales (AD y PI) con 1 ml de la suspensión conteniendo la cepa P (5011) de *S. aureus* (250 UFC) y 3 animales fueron inoculados con 1 ml de solución fisiológica estéril en los cuartos contralaterales (AD y PI). La inoculación intramamaria se realizó luego del ordeño de la tarde siguiendo el procedimiento detallado en el punto 3.3.3.

El número de animales empleados para la infección experimental con las cepas 806 (T) y 5011 (P) no permitió el tratamiento estadístico de los datos, por lo tanto los resultados obtenidos a partir de cada animal que se presentan en esta tesis son preliminares y descriptivos. Cabe señalar que se pretende dar continuidad al diseño experimental inicialmente planeado para llegar a obtener un número de animales que permita el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

3.4.4 Monitoreo de la infección intramamaria y toma de muestras de leche y sangre

Los animales fueron monitoreados diariamente hasta los 21 días post-inoculación, registrándose el estado general, presencia de inflamación en la glándula mamaria, apariencia macroscópica de la leche, apetito y producción de leche. Se tomaron muestras de leche y de sangre periférica pre y post-inoculación intramamaria siguiendo el cronograma detallado en la figura 8.



Figura 8. Cronograma de toma de muestras de leche y sangre pre-inoculación (pre-i) y post-inoculación (post-i). Sem: semanas; Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-i; Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i.

Toma de muestras pre-inoculación (pre-i): 2 y 1 semana previas a la inoculación y tiempo (Ti) 0 pre-i.

- a) Muestras de leche: 30 ml para RCS, 5 ml para cultivo microbiológico y 9 ml para ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Las muestras se tomaron antes del ordeño en forma aséptica.
- b) Muestras de sangre periférica: 100 ml para la extracción de células mononucleares (basales pre-inoculación). La toma de muestra se realizó de la vena mamaria craneal al finalizar el ordeño.

Toma de muestras post-inoculación (post-i): Ti0,5, Ti1, Ti2, Ti3, Ti4, Ti7, Ti14 y Ti21 post-i.

- c) Muestras de leche: 30 ml para RCS, 5 ml para cultivo microbiológico y 9 ml para ELISA. Los cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 y 5011, terminado el ensayo (Ti 21), se evaluaron adicionalmente por microbiología durante 5 semanas con intervalos de 7 días para monitorear el desarrollo de una infección crónica.
- d) Muestras de sangre periférica: 100 ml para la extracción de células mononucleares, evaluación de poblaciones celulares.

3.4.4.1 Recuento de células somáticas.

Las muestras de leche de cada cuarto y de cada tiempo de muestreo fueron rotuladas, refrigeradas a 4 °C y enviadas al Laboratorio ALECOL para el RCS.

3.4.4.2 Cultivos microbiológicos

Las muestras de leche de cada cuarto y de cada tiempo de muestreo se sembraron en estrías en agar sangre (5%) y se incubaron en estufa a 37 °C por 24 a 48 hs en forma aeróbica. En los casos donde se observó desarrollo de colonias con doble hemolisis y morfología compatible con *S. aureus*, se realizó la caracterización fenotípica mediante pruebas bioquímicas (Oliver y col., 2004). Las colonias identificadas como *S. aureus* se repicaron en agar base y se conservaron a -80°C en CTS (Britania) y glicerol 15% V/V (Merk) para realizar la posterior tipificación de la cepa por PFGE.

3.4.5 Evaluación de la respuesta inmune en leche.

Se evaluó la respuesta inmune a partir de muestras de leche de cuartos infectados con las cepas de *S. aureus* 806 (T) o 5011 (P) y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre y post-inoculación: Ti0 (pre-i), Ti0,5, Ti1, Ti2, Ti3, Ti4, Ti7, Ti14 y Ti21 post-i. Se evaluaron las concentraciones de ON, IL-1 β , IL-6 e IL-4; así como los niveles de IgG específicos.

3.4.5.1 Evaluación de la producción de ON.

Se realizó la evaluación de la producción de ON midiendo su metabolito más estable, el nitrito (NO₂), siguiendo la metodología de Bouchard y col. (1999) con modificaciones. Para ello, 1 ml de las muestras de leche fueron tratadas con 1,5 ml de acetato de sodio 0,1 M frío, pH 4,0, para precipitar las caseínas. Las muestras se clarificaron por centrifugación (4.000 g por 10 min) y los sobrenadantes se incubaron durante 10 min en un baño de agua hirviendo para inactivar las proteasas. Después de enfriar las muestras a temperatura ambiente, el pH se ajustó a 7 con hidróxido de sodio 5 N. Las muestras se clarificaron por centrifugación a 10.000 g por 10 min. La concentración de NO₂ en leche se midió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.5. La concentración de NO₂ se calculó mediante una curva de calibración realizada entre 0,78 y 100 μ M de nitrito utilizando nitrito de sodio (proporcionado por el kit) como estándar.

3.4.5.2 Evaluación de la producción de IL-1 β , IL-6 e IL-4 mediante ELISA sándwich.

Las muestras de leche destinadas a los ensayos de ELISA fueron descongeladas y desengrasadas siguiendo un protocolo de rutina. Brevemente, se centrifugaron a 1.500 g

durante 20 minutos a 4°C. Luego, se extrajo con espátula la grasa adherida a las paredes de la parte superior del tubo. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a 14.700 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se extrajo la porción acuosa superior con jeringa de 1 ml y aguja, colocándose alícuotas en tubos Eppendorf de 0,5 ml a -80°C.

Las citoquinas se cuantificaron utilizando los kits de ensayo inmunoabsorbente (ELISA) de IL-1 β , IL-6 e IL-4 comercial bovina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.). La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro de microplaca (A450 nm menos A550 nm) y las concentraciones se extrapolaron de la curva estándar realizada con IL-1 β bovina recombinante, IL-6 e IL-4 proporcionadas por los kits. Los datos se expresaron en picogramos por mililitro (pg/ml).

3.4.5.3 Evaluación de los niveles de IgG específica.

Se realizó un ELISA para detectar anticuerpos específicos de antígeno, IgG total procedimiento descrito por Renna y col. (2019) con algunas modificaciones. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano (GBO) con 100 μ l de un lisado de *S. aureus* correspondiente a la cepa 806 (T) o 5011 (P) (100 μ g/ml, ver anexo 1). Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche en cámara húmeda y a continuación, previo lavado con PBS-Tween (PBS-T, 3 lavados con 300 μ l cada uno) se bloquearon con solución de bloqueo (PBS-leche de cabra descremada al 5%) durante 30 minutos a 37°C. Luego de tres lavados con PBS-T las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora con las muestras de leche sin diluir. Transcurrida la incubación, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS-T y seguidamente las placas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa alcalina (SIGMA-ALDRICH) durante 45 minutos a 37°C. Luego de ese tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-T y se incubaron las placas con la solución de sustrato/cromógeno TMB (General Electric) durante 5 minutos. La reacción se detuvo con HCl 1N y finalmente se midió la DO a 450 nm utilizando el equipo SPECTROstar^{Nano}. La confirmación de la ausencia de anticuerpos contra *S. aureus* en la leche de cabra descremada fue realizada por ELISA, utilizando la solución de bloqueo (PBS + leche de cabra al 5%) como una muestra. Los valores de DO para esta solución fueron menores que los de los controles negativos. Los niveles de IgG total específica para *S. aureus* se expresaron como DO.

3.4.6 Evaluación de dinámica de las poblaciones celulares en sangre.

Se determinó la dinámica de las poblaciones celulares en sangre (pre y post-inoculación) mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para identificar linfocitos B (CD21); linfocitos T (CD8+, CD4+ y $\gamma\delta$); monocitos-macrófagos (CD14). La determinación se realizó a partir de muestras de sangre periférica de los animales infectados con las cepas de *S. aureus* 806 (T), 5011 (P) y controles inoculados con solución fisiológica en los tiempos T 0 pre-inoculación, Ti 0,5, Ti 1, Ti 2, Ti 3, Ti 4, Ti 7, Ti 14 y Ti 21 días post-i.

3.4.6.1 Purificación y aislamiento de leucocitos totales de sangre periférica.

Los leucocitos totales de sangre periférica se purificaron siguiendo la metodología previamente descrita por Beccaria y col. (2018) con modificaciones. Brevemente, las muestras de sangre anticoagulada de los animales infectados con las cepas de *S. aureus* 806 (T), 5011 (P) y controles inoculados con solución fisiológica se centrifugaron a 2.000 rpm por 15 min a 4 °C. Luego de la centrifugación se eliminó el plasma de la capa superior, se resuspendió el paquete conteniendo los leucocitos totales y glóbulos rojos en buffer de lisis (Anexo 1) hasta completar los 50 ml y se incubó durante 10 min a 4 °C para lograr la lisis completa de los glóbulos rojos. Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Luego de descartar el sobrenadante, se realizó una segunda lisis resuspendiendo a las células en 5-10 ml de buffer de lisis durante 5 min. Finalizado el tiempo de incubación, se agregó PBS 1X hasta completar los 50 ml, se centrifugó a 2000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 ml de RPMI/10% SFB. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y utilizadas para los ensayos que se describen a continuación.

3.4.7 Evaluación de la respuesta inmune en sangre periférica.

3.4.7.1 Evaluación de la cinética de las diferentes poblaciones de células inmunes en diferentes momentos post-infección mediante citometría de flujo.

Se evaluó por citometría de flujo la cinética de las poblaciones de células inmunes a nivel sistémico a partir de leucocitos totales aislados de sangre periférica de los animales

infectados con las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P) y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos pre y post-inoculación: Ti0 (pre-i), Ti0,5, Ti1, Ti2, Ti3, Ti4, Ti7, Ti14 y Ti21 post-i. Se utilizaron los siguientes anticuerpos comerciales para identificar linfocitos B (anti-CD21); linfocitos T CD3+ (anti-CD3); linfocitos T CD8+ (anti-CD8); linfocitos T CD4+ (anti-CD4); linfocitos T $\gamma\delta$ (anti-WC1); y monocitos macrófagos (anti-CD14). Los anticuerpos utilizados y las concentraciones de los mismos se detallan en la tabla 18.

Tabla 18. Anticuerpos utilizados en cinética de las diferentes poblaciones en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T), 5011 (P) y controles.

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Dilución [#]
Mouse anti bovine CD21*	RPE	BIO-RAD	0,5 μ l
Mouse anti bovine CD8 Beta*	RPE	BIO-RAD	0,1 μ l
Mouse anti bovine CD4*	FITC	BIO-RAD	0,25 μ l
Mouse anti bovine WC1*	FITC	BIO-RAD	2,5 μ l
Anti-bovine CD3*	-	Kingfisher Biotech, Inc.	1 μ l
Goat anti-mouse IgG Fc**	APC	Thermo Fisher	1/300
APC anti-human CD14*	APC	BioLegend	0,125 μ l

(#): Dilución en un volumen final de 24 μ l; RPE: R Phycoerythrin (Ficoeritrina); FITC: Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 (Isotiocianato de Fluoresceína); APC: Allophycocyanin; (*): primario; (**): secundario.

Brevemente, las células fueron incubadas con los anticuerpos específicos para los diferentes marcadores de superficie en PBS-EDTA-SFB a 4°C durante 30 min en oscuridad. Luego de la incubación, las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario respectivo cuando correspondiera. Nuevamente, después del lavado, las células se resuspendieron en fluido de enfoque y fueron adquiridas en el citómetro de flujo Attune NxT (Renna y col., 2012). Se seleccionó la región R1 que contenía a la población de células mononucleares teniendo en cuenta los parámetros de tamaño (*Side Scatter*) vs complejidad citoplasmática o granularidad (*Fordward Scatter*). La población de linfocitos T CD4+ fue identificada como CD3 positiva y CD4 positiva (doble positiva) y la población de linfocitos T CD8+ fue identificada como CD3 positiva y CD8 positiva (doble positiva). El análisis de los datos se realizó utilizando el programa Flowjo.

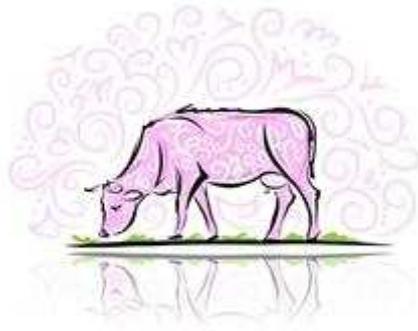
3.4.8 Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el Software SPSS 10.1, Estados Unidos. Las inferencias estadísticas se efectuaron mediante pruebas paramétricas y no-paramétricas según el caso (Spiegel, 1991). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. A continuación, se detallan los test desarrollados para el análisis de los resultados de cada ensayo:

- Las DO obtenidas de las curvas de crecimiento de cepas de *S. aureus* se analizaron utilizando el Modelo Lineal General de medidas repetidas y post test de Duncan. Los tiempos de duración de la fase de crecimiento logarítmica (*lagtime*) y los tiempos en los cuales las cepas alcanzaron su máximo crecimiento (*t at Max V*) se analizaron mediante ANOVA y post test de Duncan.
- Las UFC/ml obtenidas luego de los ensayos de persistencia con cepas de *S. aureus* en células MAC-T se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes.
- Las UFC/ml obtenidas luego de los ensayos de adherencia con cepas de *S. aureus* en células MAC-T se analizaron mediante *t* de Student.
- Los porcentajes de apoptosis y las DO obtenidos en los ensayos de viabilidad celular luego del co-cultivo de células MAC-T con las cepas de *S. aureus* en cada tiempo de muestreo se analizaron mediante ANOVA seguido del post test de Duncan.
- Los porcentajes de fagocitosis y de producción de ROS obtenidos luego del co-cultivo de macrófagos con las cepas de *S. aureus* se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes.

La cantidad de óxido nítrico producida luego del co-cultivo de macrófagos con las cepas de *S. aureus* se analizó mediante ANOVA seguido del post test de Duncan.

4 Resultados



Los resultados de los ensayos correspondientes al **objetivo específico 2.2.1** se describen entre los ítems 4.1 y 4.14 de esta sección.

4.1. Selección de cepas de *S. aureus*.

Se seleccionaron 34 cepas de *S. aureus*, 26 provenientes de IIM T (9 subclínicas y 17 clínicas) y 8 provenientes de IIM P (subclínicas). La información de cada cepa se encuentra detallada en la tabla 1 del anexo 2.

4.2. Evaluación de la presencia de genes de virulencia.

Con la finalidad de seleccionar 2 cepas de *S. aureus* con características genéticas diferenciales que puedan asociarse con la capacidad de adaptación a la GM bovina, se evaluó mediante PCR de punto final la portación de genes relacionados con la expresión de polisacáridos capsulares (*cap5* y *cap8*), producción de *biofilm* (*agr*, *ica* y *bap*) y resistencia a los antibióticos β -lactámicos (*blaZ*).

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 19. El 94% (32/34) de las cepas evaluadas en este estudio fueron positivas a uno de los dos genes que codifican para el polisacárido capsular serotipo 5 (*cap5*) o serotipo 8 (*cap8*). El 47% de las cepas evaluadas (16/34) fueron positivas a *cap5*, de éstas el 88% (14/16) fueron cepas T y el 12% (2/16) P. El 46% de las cepas (16/34) fueron positivas a *cap8*, y de éstas, un 63% (10/16) fueron cepas T y un 37% (6/16) P. Un 6% (2/34) de las cepas fueron negativas para ambos genes o no tipificables (NT).

El 94% (30/32) de las cepas de *S. aureus* se identificaron como *agrI*, de las cuales el 73% (22/30) fueron cepas T y un 27% (8/30) P. El 6% (2/32) de las cepas evaluadas fue positivo para *agrII*, y fueron cepas T. No se detectaron cepas *agrIII* y *agrIV* y en un 6% (2/34) de las cepas no fue posible la determinación para *agr*.

El 97% (33/34) de las cepas fueron positivas para *icaA* e *icaC* y el 100% (34/34) fueron positivas para *icaD*. Ninguna de las cepas evaluadas fue positiva para el gen *bap*. El 21% (7/34) fue *blaZ* positiva, de éstas el 71% (5/7) fueron cepas T y el 29% (2/7) P.

Tabla 19. Análisis de la presencia o ausencia de genes que codifican para polisacáridos capsulares (*cap5* y *cap8*), formación de *biofilm* (*agr*, *ica* y *bap*), y del gen de resistencia a los β -lactámicos (*blaZ*) en aislados de *S. aureus* procedentes de IIM T y P.

<i>Cepas de S. aureus</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>	<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	<i>blaZ</i>
3 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
8 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
14 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
17 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
20 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
25 (T)	+	-	s/i	s/i	s/i	s/i	+	+	+	-	-
37 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
48 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
61 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
110 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
117 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
126 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
127 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
133 (T)	+	-	s/i	s/i	s/i	s/i	+	+	+	-	+
157 (T)	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
164 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
179 (T)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
209 (T)	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
247 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
293 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
322 (T)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
350 (T)	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
358 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
364 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
731 (T)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
806 (T)	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
037 (P)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
316 (P)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
397 (P)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
662 (P)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
1570 (P)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
1595 (P)	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
5011 (P)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
5128 (P)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Ocurrencia (%)	47	46	94	6	0	0	97	97	100	0	21

(+): Positivo para el gen. (-): Negativo para el gen. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. s/i: Gen sin identificar.

4.3. Evaluación de la diversidad genética por PFGE.

Se realizó el análisis filogenético de los aislados, para poder discernir entre tipos y subtipos y se construyeron los dendrogramas sobre la base de los niveles de similitud. Se consideró un punto de corte del 80% de similitud para definir los grupos.

La tipificación de las 34 cepas, discriminó 27 pulsotipos o grupos, los cuales fueron designados arbitrariamente como A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, Ñ, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y Z (Figura 9).

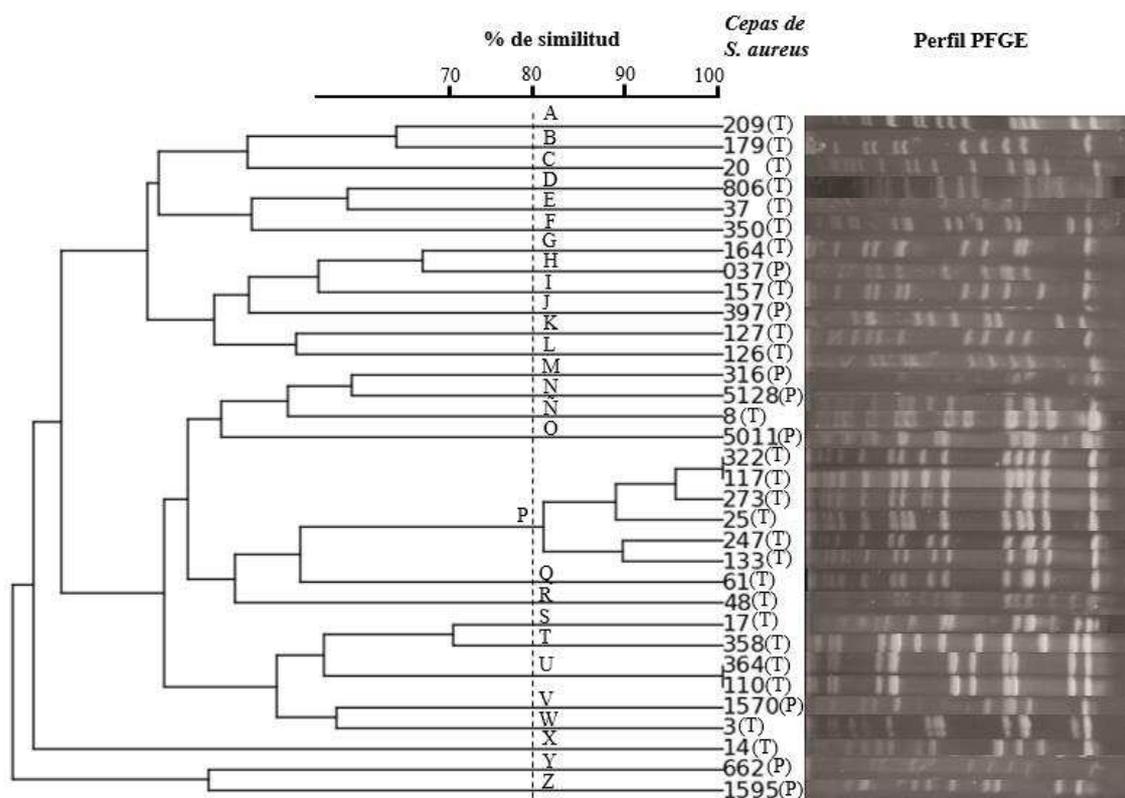


Figura 9. PFGE. Patrones de bandas obtenidos a partir de cada cepa de *S. aureus*. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): cepa aislada de una IIM persistente.

El pulsotipo con mayor número de aislamientos fue el P ($n=6$). El siguiente pulsotipo en números de aislamientos fue el U ($n=2$) donde ambas cepas presentaron el mismo número de bandas y del mismo tamaño. La agrupación en pulsotipos permitió seleccionar 6 cepas de *S. aureus* con diferentes patrones clonales, 3 de las cuales fueron de baja adaptación a la GM o T (cepas 3, 179 y 806) y 3 de alta adaptación a la GM o P (cepas 5011, 5128 y 037). Las cepas se agruparon en diferentes pulsotipos designados con letras: cepa 3 (W); 179 (B); 806 (D); 5011 (O); 5128 (N) y 037 (H).

4.4. Evaluación de la diversidad genética por genotipificación de ADN.

Las 6 cepas de *S. aureus* seleccionadas mediante PFGE fueron posteriormente caracterizadas utilizando un sistema de genotipificación de ADN basado en microarreglos. Sobre la base de los patrones de hibridación y mediante la comparación con una base de datos de cepas de referencia, los aislados se asignaron a complejos clonales (CC) utilizando la nomenclatura basada en *Multilocus Sequence Typing* (MLST). La tabla 20 muestra un resumen de la genotipificación donde se especifican los CC y afiliación de las 6 cepas de *S. aureus* analizadas. Las cepas 179, 5128 y 37 se clasificaron como CC97. La cepa 3, se clasificó como CC133 y la cepa 5011 como CC188. La cepa 806 (ST350) no se agrupó dentro de ningún CC. En el Anexo 2 se adjuntan los resultados completos de la genotipificación de ADN basado en microarreglos de las cepas de *S. aureus* evaluadas.

Tabla 20. Resumen de la genotipificación de las cepas de *S. aureus* y agrupación en complejos clonales.

Cepas de <i>S. aureus</i>	Datos de tipificación	
	Complejo clonal (CC)	Afiliación de la cepa
3	CC133	CC133-MSSA (lukF-P83/lukM+)
179	CC97	CC97/ST746-MSSA (cápsula negativa)
806	ST350	ST350-MSSA
5011	CC188	CC188-MSSA
5128	CC97	CC97-MSSA
37	CC97	CC97-MSSA-[ccrAB1]

ST: sequence type o secuenciotipo; *MSSA*: *Meticillin-sensitive Staphylococcus aureus*;

lukF: *leukocidin F*; *lukM*: *leukocidin M*.

El perfil genético arrojado por la genotipificación fue coincidente con los resultados obtenidos por PCR para los distintos genes de virulencia evaluados para cada cepa (*cap*, *ica*, *agr*, *bap* y *blaZ*). Además, permitió determinar que las 6 cepas de *S. aureus* estudiadas fueron negativas para la portación del gen *mecA*.

4.5. Evaluación de la capacidad de producir *biofilm*.

Se utilizó la cepa de referencia V329 como control positivo por su fuerte capacidad para producir *biofilm*.

Los resultados de estos ensayos evidenciaron que el 100% de las cepas evaluadas fue capaz de producir *biofilm* en diferentes grados: un 32,5% (11/34) de las cepas fue débil productora, un 32,5% (11/34) fue capaz de producir *biofilm* en forma moderada y un 35% (12/34) de las cepas fue fuerte productora de *biofilm*.

De las cepas T de *S. aureus*, el 34,6% (9/26) fue débil productora, el 34,6% (9/26) fue capaz de producir *biofilm* en forma moderada y el 30,7% (8/26) fue fuerte productora de *biofilm*. Respecto a las cepas P de *S. aureus*: el 25% (2/8) fue débil productora, el 25% (2/8) fue capaz de producir *biofilm* en forma moderada y el 50% (4/8) fue fuerte productora de *biofilm*. En la figura 10 se representan las medias de las densidades ópticas (DO) obtenidas luego del cultivo en placas de poliestireno.

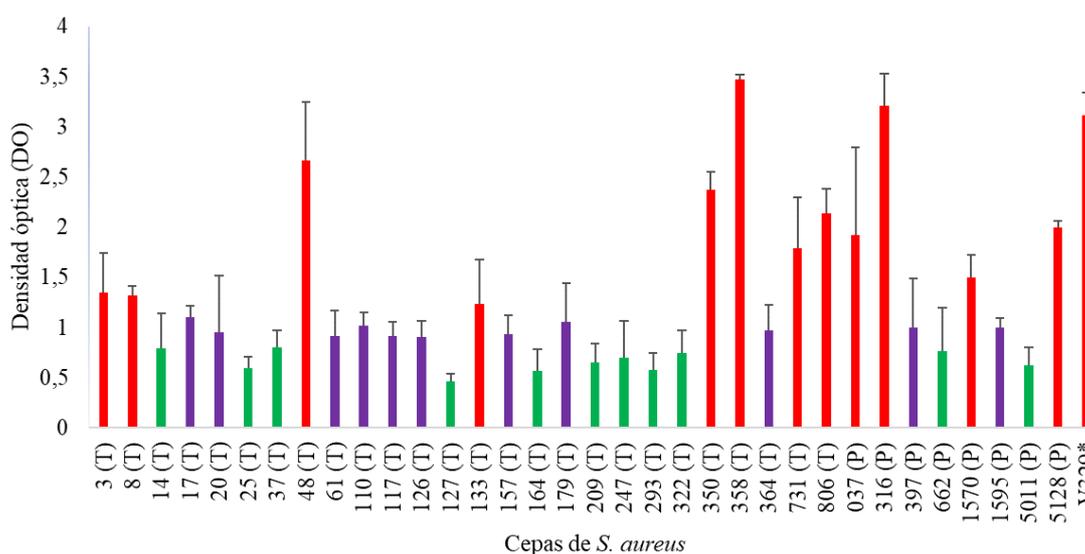


Figura 10. Representación de las densidades ópticas obtenidas luego del cultivo en placas de poliestireno de los aislados de *S. aureus* provenientes de IIM transitorias y persistentes. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Verde: débil productora de *biofilm*. Lila: moderada productora de *biofilm*. Rojo: fuerte productora de *biofilm*. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. (*) Cepa control fuerte productora de *biofilm*.

4.6. Evaluación de la capacidad de crecimiento *in vitro*.

Se evaluaron diferentes parámetros del crecimiento *in vitro* de las 6 cepas de *S. aureus* preseleccionadas. Además, se utilizaron las cepas de referencia Newbould 305 (ATCC

29740) y la V329. Las curvas de crecimiento de las diferentes cepas evaluadas durante 24 horas se presentan en la figura 11.

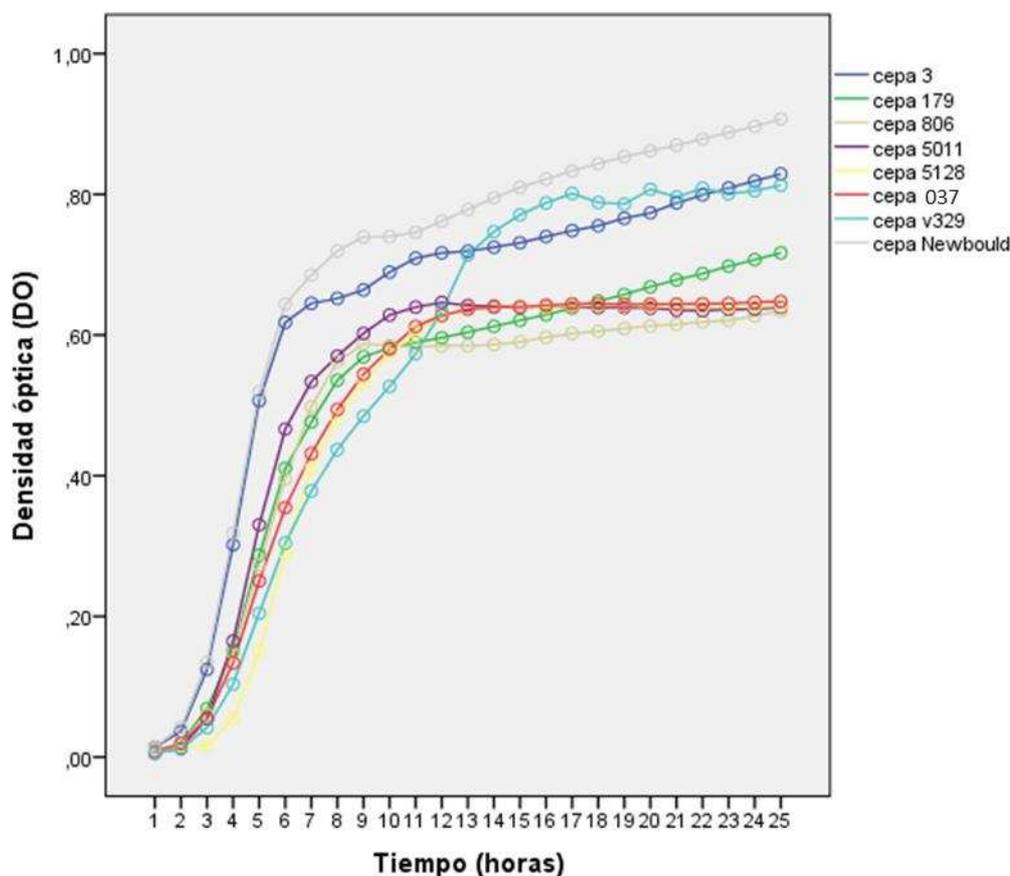


Figura 11. Curvas de crecimiento para las distintas cepas de *S. aureus* durante 24 hs. Los valores representan las medias de las densidades ópticas (DO) obtenidas a partir de tres ensayos independientes.

El crecimiento bacteriano *in vitro* (representado por los valores de DO) fue similar a lo largo del tiempo para las diferentes cepas de *S. aureus* evaluadas ($p=0,171$). La cepa Newbould fue la que presentó mayores valores de DO a lo largo del tiempo con respecto a las demás cepas estudiadas. El análisis de la duración de la fase de crecimiento logarítmica (*lagtime*) mostró diferencias entre las cepas evaluadas ($p=0,003$). La cepa V329 fue la que presentó la fase de crecimiento logarítmica más prolongada (301 ± 168 min), mostrando diferencias significativas con las demás cepas estudiadas ($p<0,05$). Se pudo observar, que el tiempo en el que todas las cepas alcanzaron su máximo crecimiento (*t at Max V*) fue superior al tiempo de duración de la fase de crecimiento logarítmica. El análisis del tiempo en el que cada cepa alcanzó el máximo crecimiento mostró diferencias

entre las mismas ($p=0,001$). La cepa V329 fue la que mostró menor velocidad de crecimiento, ya que demoró 442 ± 213 minutos para alcanzar su máximo desarrollo, mostrando diferencias significativas con las demás cepas estudiadas ($p<0,05$). En la tabla 21 se muestran los tiempos de duración de la fase de crecimiento logarítmica y velocidad de crecimiento de las diferentes cepas de *S. aureus* evaluadas.

Tabla 21. Tiempos de duración de la fase de crecimiento logarítmica y velocidad de crecimiento de las diferentes cepas de *S. aureus* evaluadas.

Cepa	Lagtime (minutos)	T at Max V (minutos)
3	111 ± 14^a	193 ± 2^a
179	166 ± 68^a	280 ± 78^a
806	159 ± 57^a	265 ± 70^a
5011	131 ± 21^a	230 ± 35^a
5128	153 ± 54^a	250 ± 62^a
037	175 ± 89^a	270 ± 94^a
Newbould	100 ± 11^a	185 ± 15^a
V329	301 ± 168^b	442 ± 213^b

Lagtime: duración de la fase de crecimiento logarítmica en minutos. T at Max V: tiempo en el que cada cepa alcanzó el máximo crecimiento en minutos. Los datos representan las medias \pm desvío estándar (DS) correspondientes a tres ensayos independientes. En cada columna, diferentes letras denotan diferencias significativas entre las cepas ($p<0,05$).

4.7. Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmica y estacionaria en células MAC-T.

No se observaron diferencias significativas entre el número de UFC/ml recuperadas luego de enfrentar a las células MAC-T con ambas cepas de *S. aureus* en ninguna de las dos fases de crecimiento evaluadas. Sin embargo, cuando se utilizaron ambas cepas de *S. aureus* crecidas en fase logarítmica, los resultados obtenidos mostraron una menor variabilidad intra e inter ensayo en comparación con los obtenidos cuando se utilizaron las mismas cepas crecidas en fase estacionaria (Figura 12). En función de los resultados obtenidos, se seleccionó la fase de crecimiento logarítmica para realizar los ensayos de internalización de 7 cepas de *S. aureus* previamente caracterizadas y seleccionadas.

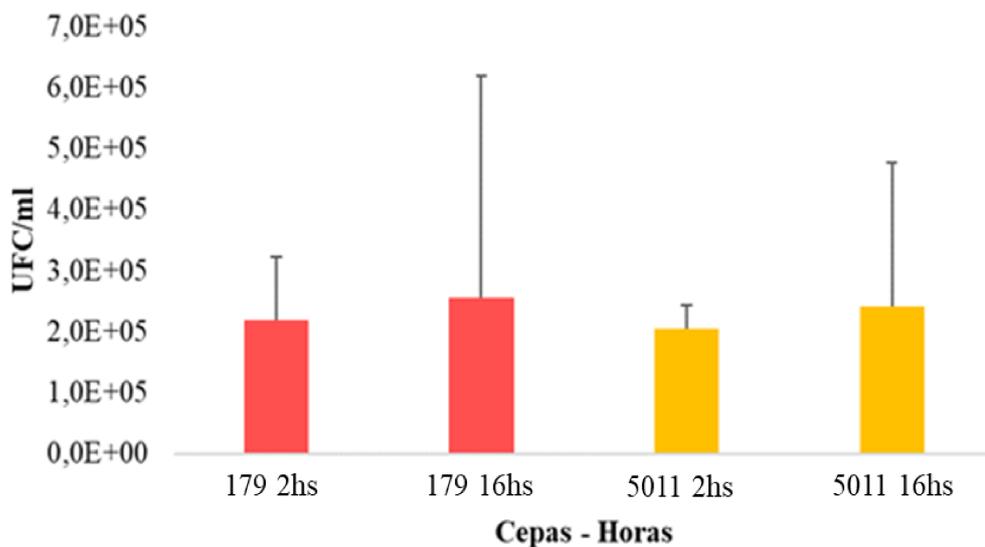


Figura 12. Número de UFC/ml recuperadas de células MAC-T luego de la infección con las cepas de *S. aureus* 179 (T) y 5011 (P) crecidas en fase de crecimiento logarítmico (2 hs) y estacionaria (16 hs). Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes.

4.8. Evaluación de la capacidad de internalización de cepas de *S. aureus* en células MAC-T.

Se evaluó la capacidad de internalización de 7 cepas de *S. aureus* seleccionadas en función de su perfil genético de virulencia (*ica*, *bap*, *agr*, *blaZ*, *cap*), su capacidad para producir *biofilm* (débil, moderada o fuerte), su pulsotipo (PFGE), CC y la capacidad de adaptación a la GM e inducir IIM P o T. En base a estos criterios se seleccionaron las siguientes cepas de *S. aureus*: 3, 179 y 806 (procedentes de IIM T) y 037, 5011 y 5128 (procedentes de IIM P). Se incluyó la cepa V329, fuerte productora de *biofilm*, para evaluar la capacidad de internalización de una cepa *bap* positiva. Se observaron diferencias significativas en la capacidad de internalización de las cepas evaluadas ($p < 0,05$) (Figura 13). La cepa 806 mostró una capacidad de internalización significativamente menor a las demás cepas ($p < 0,05$), recuperándose del lisado de las MAC-T $5,08E+04$ UFC/ml promedio. Por otra parte, la cepa 3 fue la que mayor capacidad de internalización presentó mostrando diferencias significativas con la cepa 806 ($p < 0,05$), recuperándose del lisado de las células MAC-T $7,36E+05$ UFC/ml promedio.

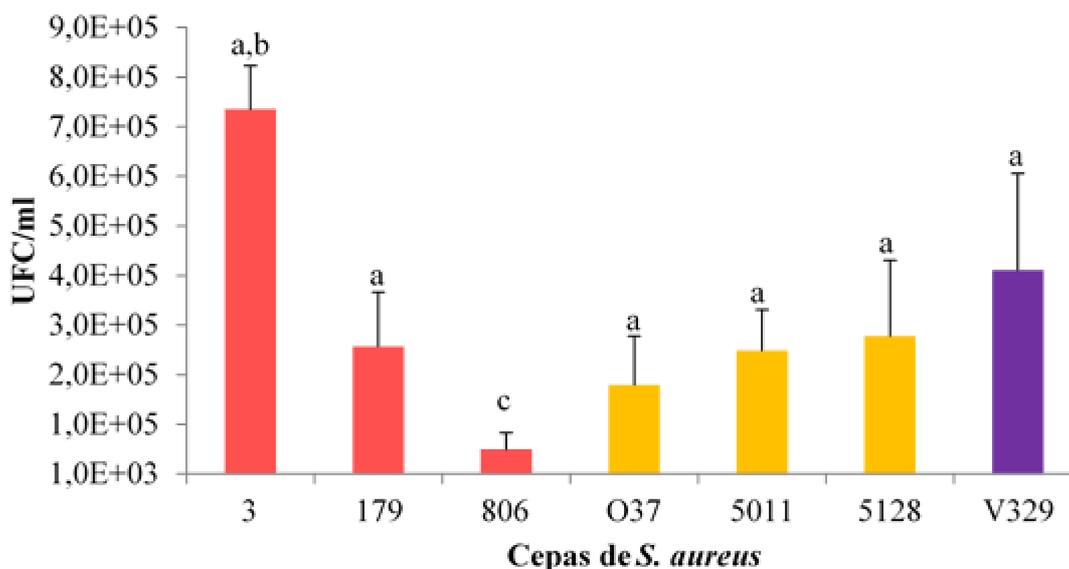


Figura 13. Número de UFC/ml recuperadas de las células MAC-T luego de la infección con diferentes cepas de *S. aureus*. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas entre las cepas ($p < 0,05$). Se representan en color rosado las cepas transitorias (3, 179 y 806), en amarillo las persistentes (037, 5011, 5128) y en lila la cepa de referencia *bap* positiva (V329).

4.9. Evaluación de la capacidad de adherencia de cepas de *S. aureus* en células MAC-T.

A los fines de continuar con los ensayos de adherencia y persistencia en células MAC-T y en base a los resultados obtenidos de los ensayos de internalización, se seleccionaron de 2 cepas de *S. aureus*: una con baja capacidad de internalización (cepa 806, aislada de IIM T) y otra con alta capacidad de internalización (cepa 5011, aislada de IIM P). Los resultados obtenidos (Figura 14) mostraron que las 2 cepas de *S. aureus* presentaron diferente capacidad de adherencia a las células MAC-T ($p = 0,001$); siendo la cepa 5011 (P) la que logró una mayor capacidad de adherencia ya que el número de UFC/ml que se recuperó ($4,27E+06 \pm 1,95E+06$) fue mayor en comparación con la cepa 806 (T) ($3,41E+05 \pm 1,92E+05$).

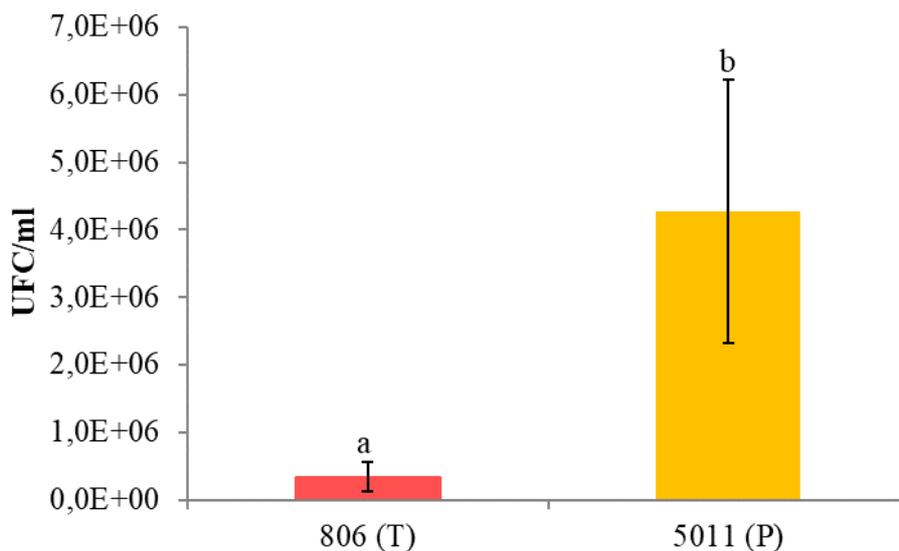


Figura 14. Número de UFC/ml adheridas a las células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P). Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

4.10. Evaluación de la capacidad de persistencia de cepas de *S. aureus* en células MAC-T.

Se evaluó la capacidad de persistencia de las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P) en células MAC-T hasta las 96 hs post-infección (pi). Los resultados mostraron que las 2 cepas de *S. aureus* presentaron diferente capacidad para persistir en las células MAC-T a lo largo del tiempo. La cepa 806 (T) sólo pudo recuperarse de los lisados de las células MAC-T luego de las 4 hs del co-cultivo y la cantidad de UFC/ml recuperada fue significativamente inferior ($8,5E+03 \pm 5+E02$ UFC/ml) a la obtenida para la cepa 5011 (P) ($p=0,002$) en este mismo periodo de tiempo (Figura 15). Por otra parte, la cepa 5011 (P) pudo recuperarse a partir de los lisados de las células MAC-T desde las 4 hasta las 72 hs pi. A las 4 hs del co-cultivo se recuperó el mayor número de bacterias ($6,5E+04 \pm 5,2E+04$ UFC/ml) y a las 72 hs el menor número ($2,1E+02 \pm 5,7E+01$ UFC/ml). A las 96 h del co-cultivo no fue posible recuperar bacterias de la cepa 5011 (P) del interior de las células MAC-T.

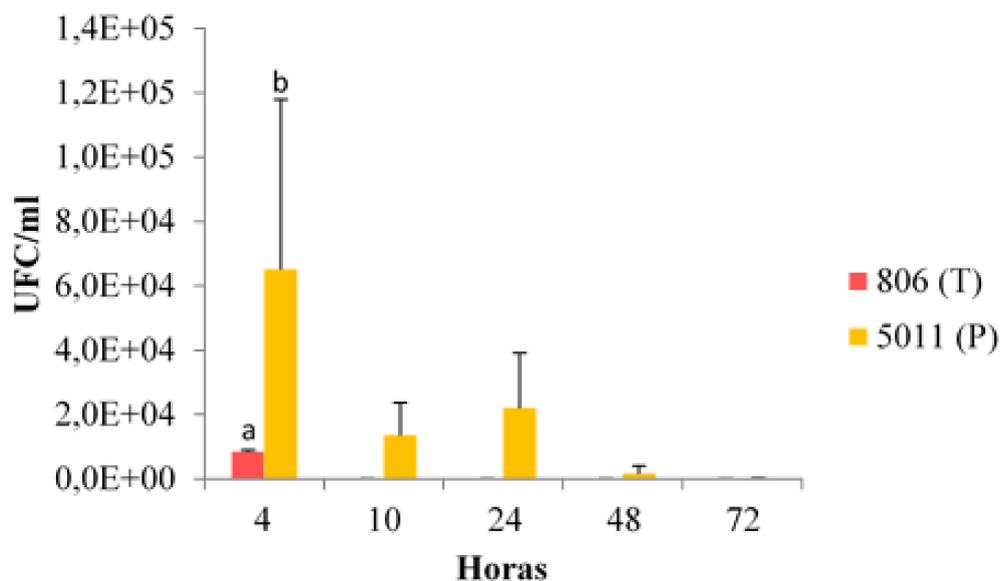


Figura 15. Número de UFC/ml recuperadas del interior de las células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P). Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

4.11. Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* para inducir muerte en células MAC-T.

En la figura 16 se muestran imágenes representativas de la evaluación de la muerte de células MAC-T a las 24 hs del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron que para ambas cepas de *S. aureus* la muerte celular fue por apoptosis en todos los tiempos evaluados. Asimismo, se observaron diferencias en la inducción de apoptosis entre ambas cepas a lo largo del tiempo (Figura 17). A las 24 hs pi ambas cepas indujeron los mayores porcentajes de apoptosis ($p < 0,05$) en relación al basal (MAC-T no infectadas). La cepa 5011 (P) indujo mayores porcentajes de apoptosis en relación a la cepa 806 (T) y al basal a las 4, 24 y 48 hs pi ($p < 0,05$). A las 72 hs pi los porcentajes de apoptosis de ambas cepas fueron similares al basal.

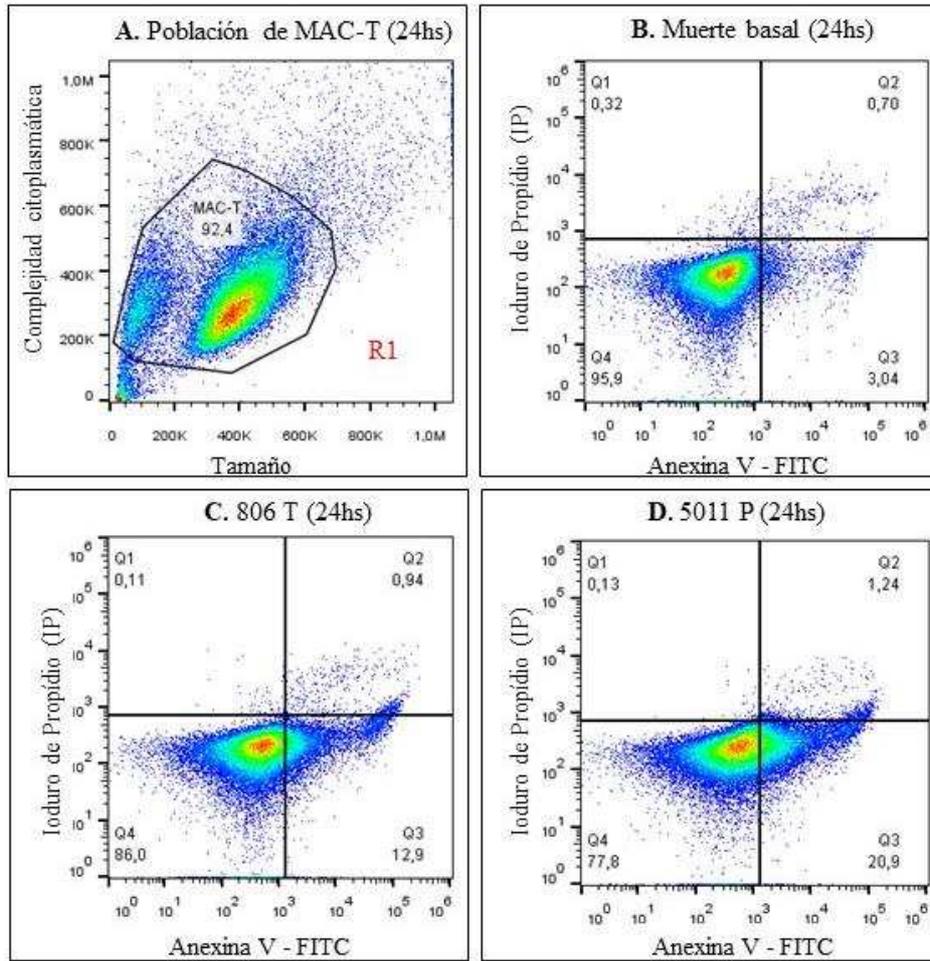


Figura 16. Determinación de la muerte de células MAC-T mediante citometría de flujo. **A.** Gráfico Dot Plot que muestra la selección de la región donde se encuentra la población celular a evaluar (R1). **B.** Gráfico Dot Plot que muestra los porcentajes de muerte basal de un cultivo de células MAC-T no infectadas a las 24 hs de incubación. **C.** Gráfico Dot Plot que muestra los porcentajes de muerte de un cultivo de células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) durante 24 hs. **D.** Gráfico Dot Plot que muestra los porcentajes de muerte de un cultivo de células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) durante 24 hs.

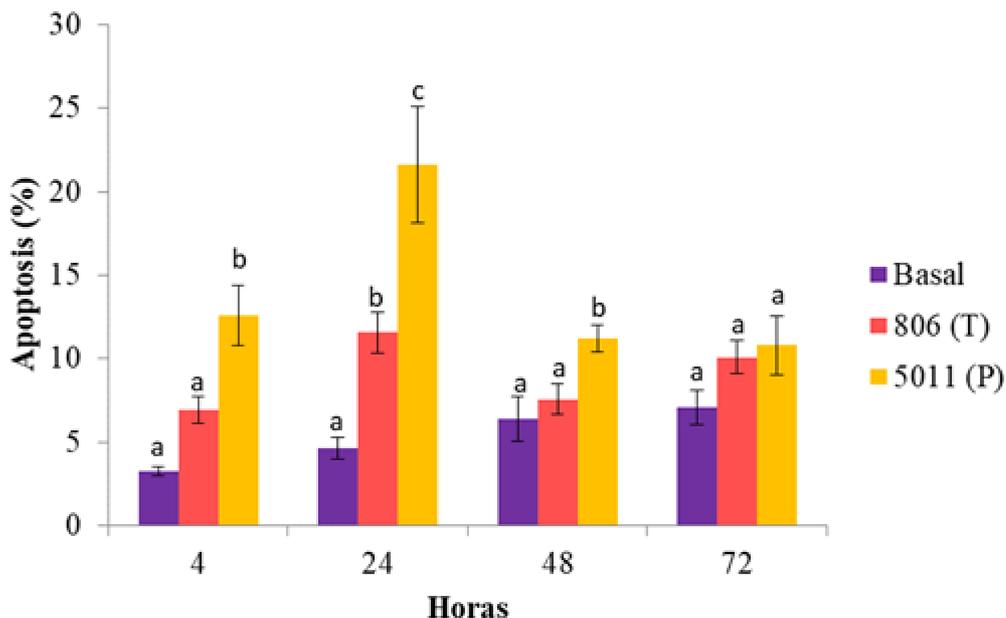


Figura 17. Porcentaje de apoptosis en células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus*. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Basal: MAC-T no infectadas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

4.12. Evaluación de la viabilidad de las células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas de *S. aureus*.

Los resultados obtenidos mostraron que a las 4 hs pi no se observaron diferencias entre las células MAC-T infectadas con las cepas 806 (T) y 5011 (P) y células no infectadas (basal). A las 24 hs pi, la viabilidad de las células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) fue similar a la basal y mayor a la de las células infectadas con la cepa 5011 (P) ($p < 0,05$). A las 48 y 72 hs pi la viabilidad de las células MAC-T infectadas fue similar para ambas cepas y menor a la observada en las células no infectadas ($p < 0,05$) (Figura 18).

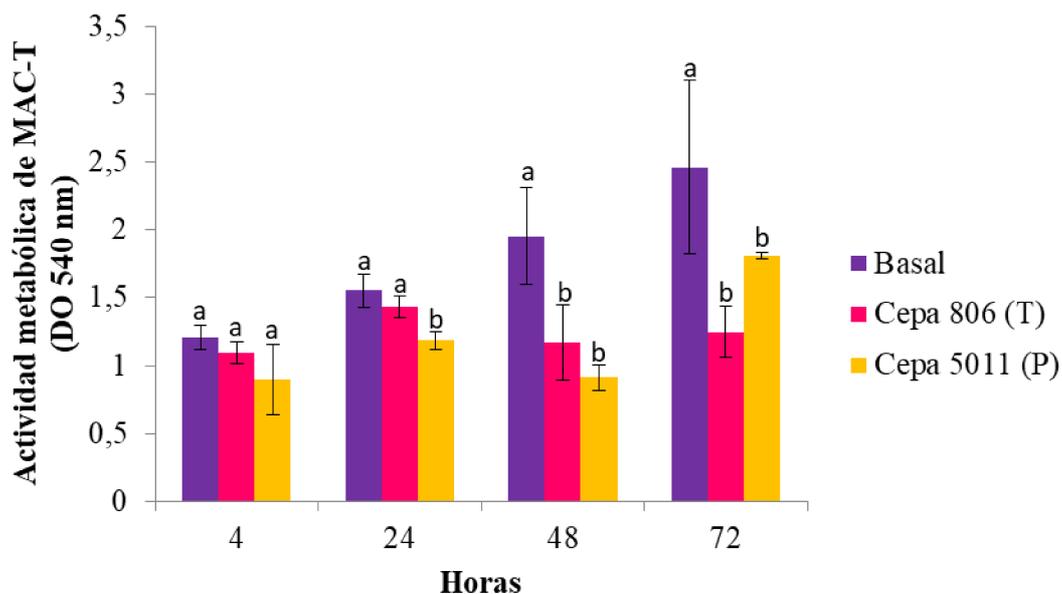


Figura 18. Evaluación de la viabilidad de células MAC-T luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* mediante ensayos de reducción del XTT. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Basal: células MAC-T no infectadas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

4.13. Evaluación de la viabilidad de las cepas de *S. aureus* en el interior de las células MAC-T.

En las figuras 19 a 24 se muestran imágenes representativas de las monocapas de células MAC-T infectadas con ambas cepas de *S. aureus*, donde se observa la presencia de bacterias intracitoplasmáticas vivas (positivas a Syto9) o muertas (positivas a IP) a las 4, 10, 24, 48 y 72 hs pi. En las células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) se evidenció la presencia de bacterias viables (positivas a Syto9) intracitoplasmáticas desde las 4 hasta las 48 hs pi, mostrando una densidad decreciente con el progreso del tiempo. A las 72 hs del co-cultivo no fue posible identificar bacterias viables en el citoplasma de las células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) de *S. aureus*. En las células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se evidenció la presencia de bacterias viables intracitoplasmáticas desde las 4 hasta las 72 hs pi, mostrando una densidad mayor a la observada con la cepa 806, la cual fue decreciendo con el progreso del tiempo. Se observaron bacterias muertas (positivas a IP) en el interior de las MAC-T infectadas con las cepas T y P en todos los tiempos evaluados excepto a las 72 hs pi. El número de

bacterias positivas a IP fue escaso a las 4 hs pi y aumentó hasta las 24 hs pi y luego disminuyó hasta las 72 hs pi; en este último tiempo no se detectaron bacterias positivas a IP para ninguna cepa.

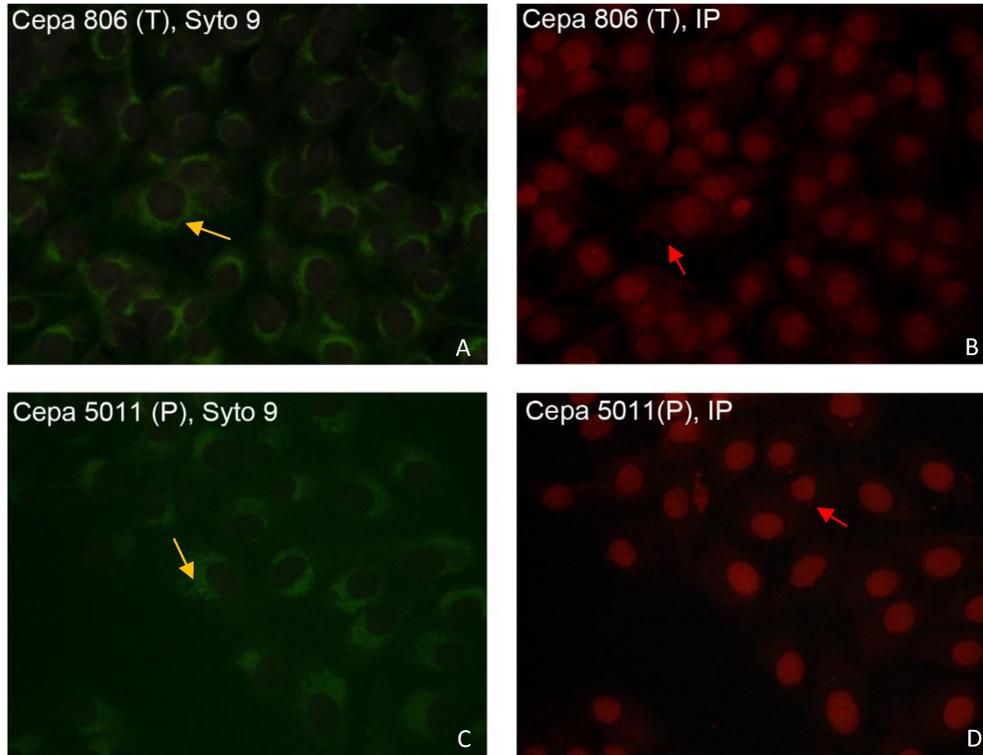


Figura 19. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 4 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (400x). **A y C:** Las flechas amarillas indican bacterias marcadas con Syto9 (fluorescencia verde) en el citoplasma de las MAC-T infectadas. **B y D:** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propídio (IP) (fluorescencia roja) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

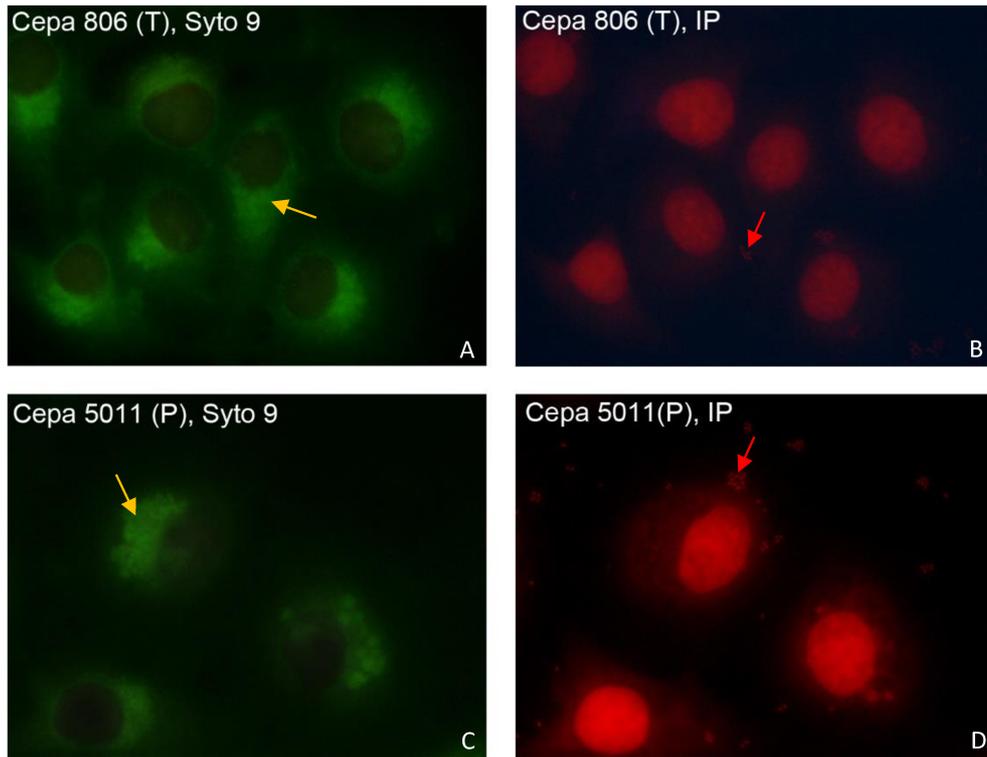


Figura 20. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 4 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (1000X). **A y C:** Las flechas amarillas indican bacterias marcadas con Syto9 (fluorescencia verde) en el citoplasma de las MAC-T infectadas. **B y D:** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propídio (IP) (fluorescencia roja) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

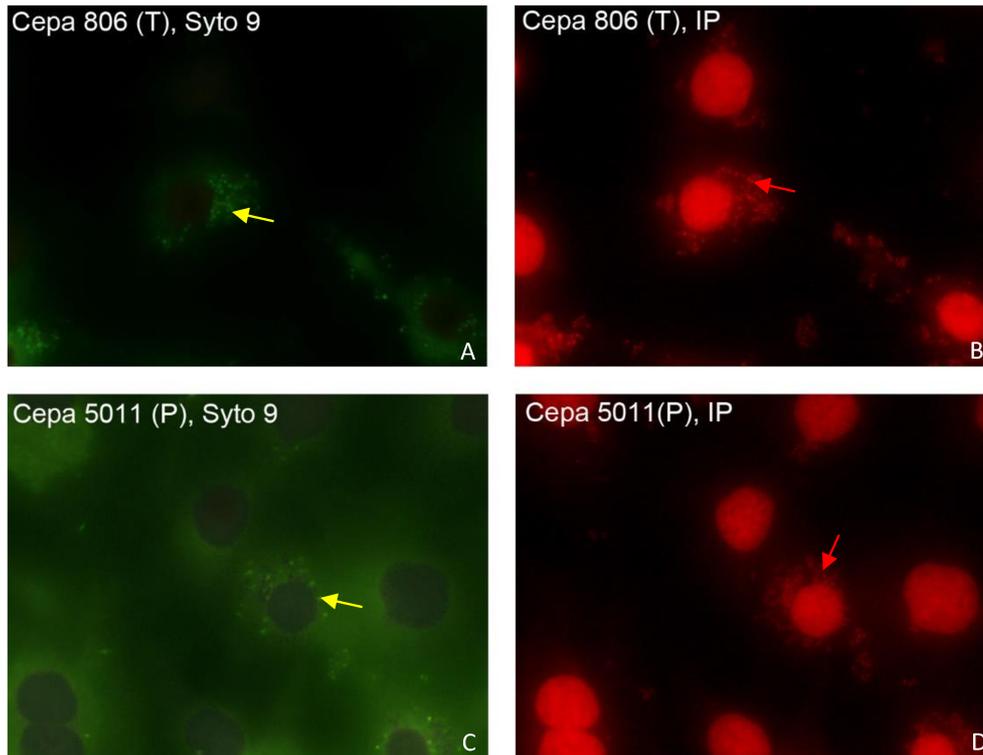


Figura 21. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 10 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (1000x). **A y C:** Las flechas amarillas indican bacterias marcadas con Syto9 (fluorescencia verde) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. Se observa mayor densidad de bacterias marcadas con Syto9 en las células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) en comparación con la cepa 806 (T) **B y D:** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propidio (IP) (fluorescencia roja) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

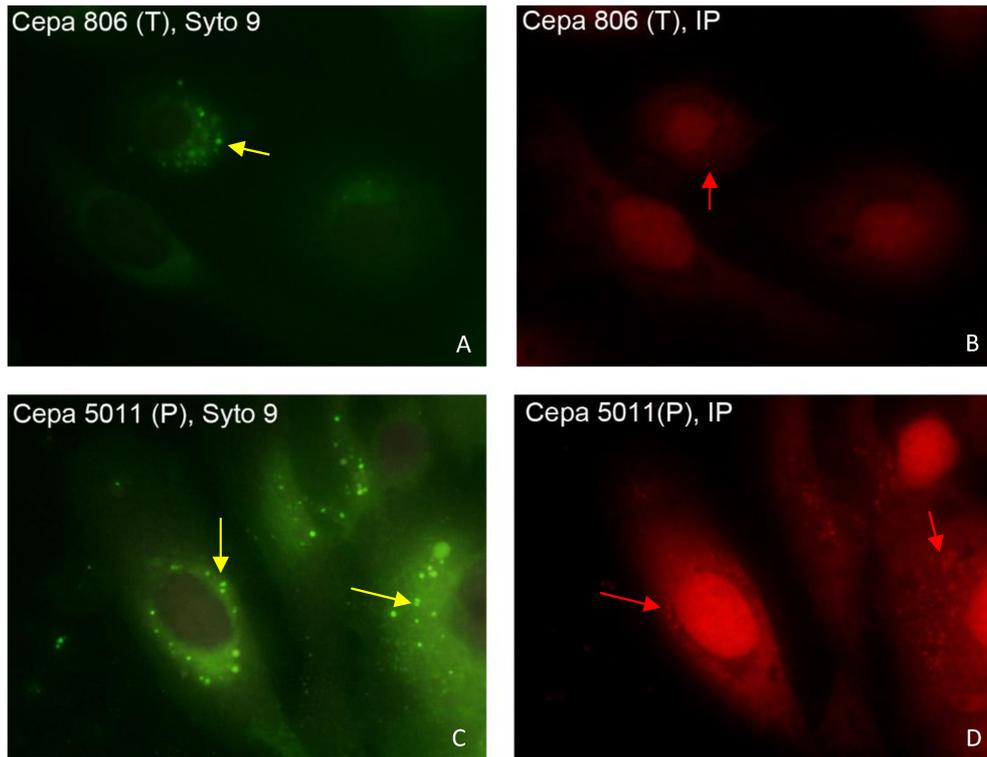


Figura 22. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 24 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (1000x). **A y C.** Las flechas amarillas indican bacterias marcadas con Syto9 (fluorescencia verde) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. **B y D.** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propidio (IP) (fluorescencia roja) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

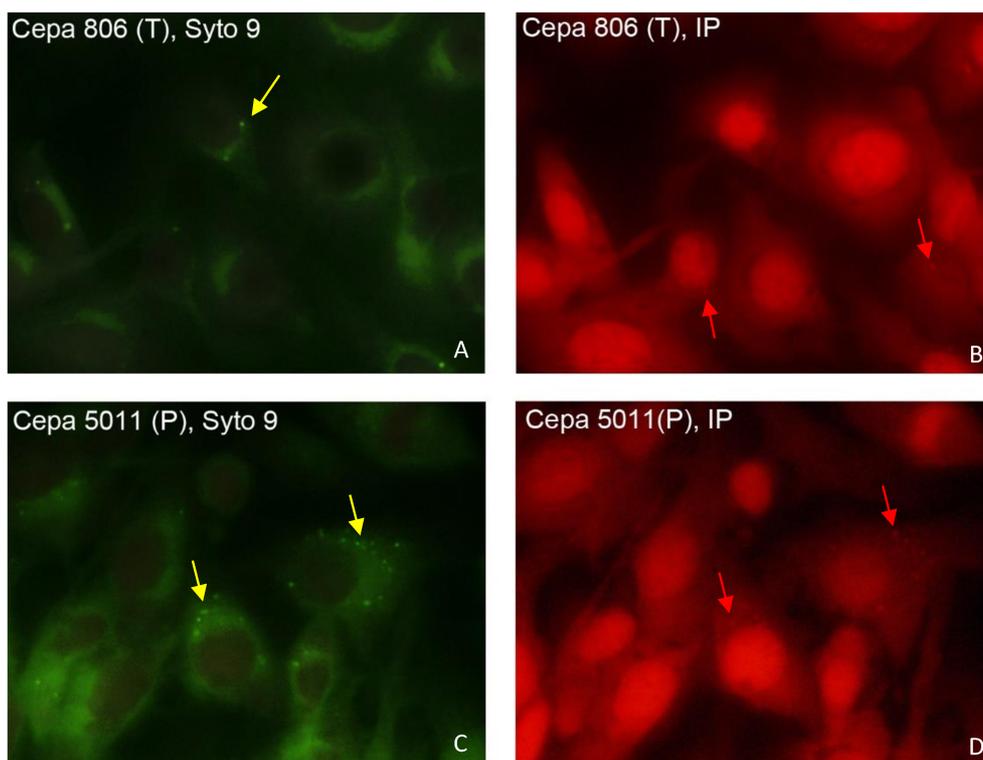


Figura 23. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 48 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (1000x). **A y C.** Las flechas amarillas indican bacterias marcadas con Syto9 (fluorescencia verde) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. Se observa mayor densidad de bacterias marcadas con Syto9 en el citoplasma de las células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) en comparación con la cepa 806 (T). **B y D.** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propidio (IP) (fluorescencia roja) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas. Tanto en las células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) como en las infectadas con la cepa 5011 (P) se observó una escasa cantidad de bacterias marcadas con IP. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

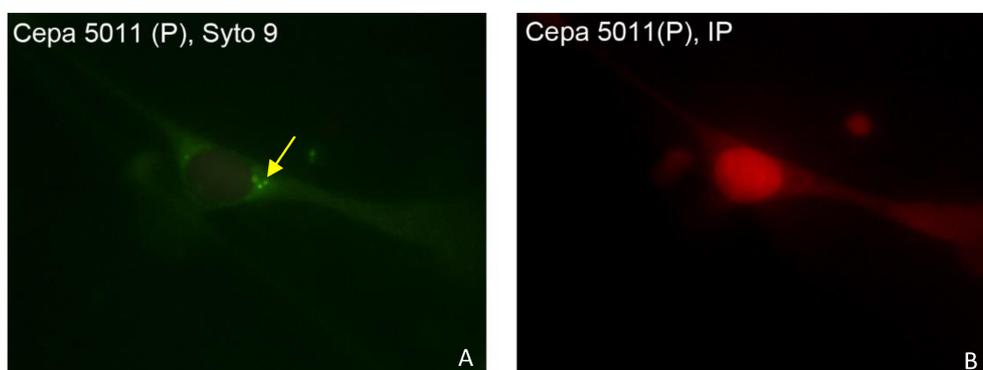


Figura 24. Microscopía de fluorescencia en células MAC-T a las 72 hs post-infección con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* (1000x). Las células MAC-T infectadas con la cepa

806 (T) no presentaron bacterias intracitoplasmáticas. **A.** La flecha amarilla indica bacterias marcadas con Syto9 (fluorescencia verde) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*. **B.** Ausencia de bacterias marcadas con ioduro de propídio (IP) en el citoplasma de las células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

Para cumplir con el **objetivo específico 2.2.2** se realizaron los ensayos comprendidos en los ítems del punto 4.14 y 4.16.

4.14. Evaluación de la capacidad de las cepas T y P de *S. aureus* de inducir actividad fagocítica y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos.

En la figura 25 se muestran imágenes representativas de los porcentajes de producción de ROS en macrófagos luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* evaluados mediante citometría de flujo. El panel A de la figura muestra un gráfico representativo del tamaño de las poblaciones celulares donde se visualiza área vs altura para la selección de la población de “singletes” o células únicas contenidas en la región R1. En el panel B de la figura se observa un gráfico representativo de complejidad citoplasmática vs tamaño celular donde se definió la región R2 que contiene a la población de macrófagos. Dentro de esta región se realizó el análisis de la fagocitosis y producción de ROS. El panel C de la figura muestra un histograma representativo de fluorescencia verde, en donde se definió la región R3 que contiene a la población de macrófagos FITC+, es decir que tienen al menos una bacteria asociada. Dentro de esta región (conteniendo macrófagos en contacto con al menos una bacteria) o dentro de la región R2 (conteniendo macrófagos totales) se realizó el análisis de la producción de ROS, como se puede observar en el histograma representativo que se muestra en el panel D de la figura.

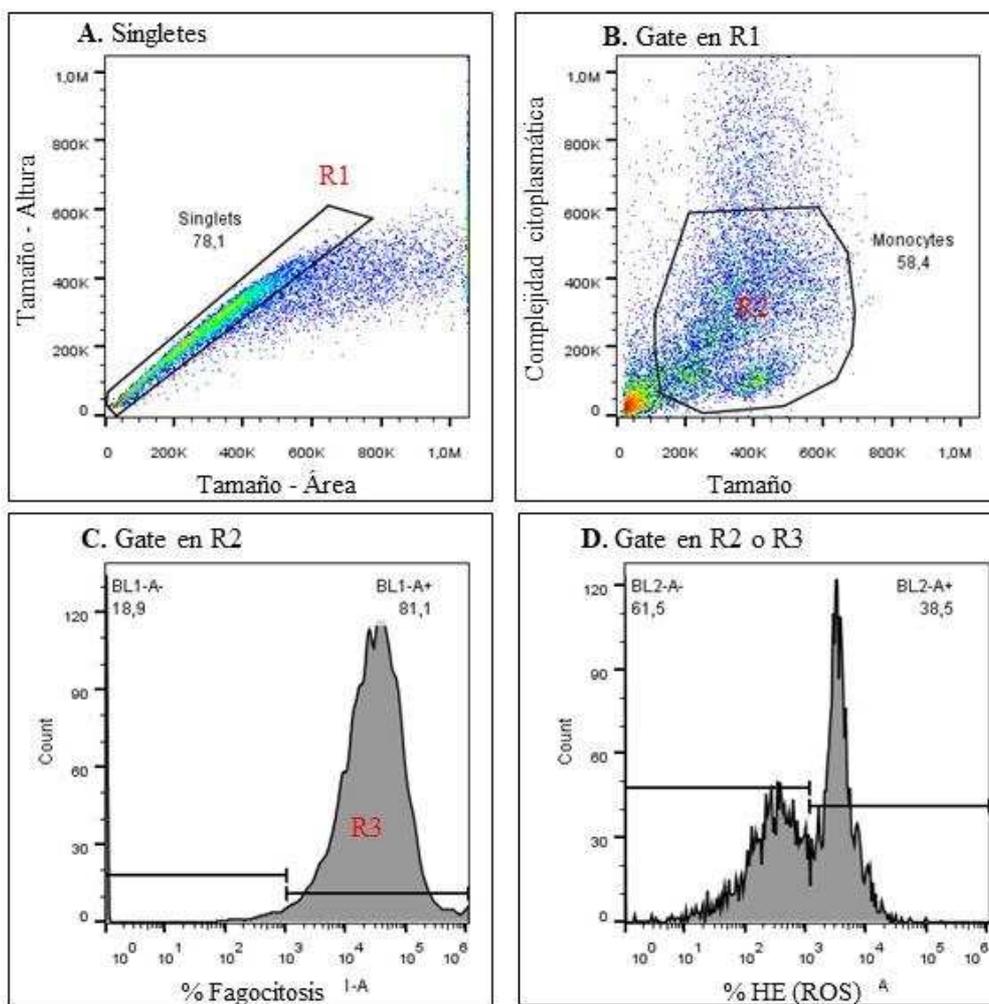


Figura 25. Estrategia de “gating” utilizada para el análisis de la fagocitosis y producción de ROS en la población de macrófagos totales y con al menos una bacteria asociada (adherida y/o internalizada). **A.** Gráfico dot plot representativo de la eliminación de dobletes donde se define la región R1 que solo contiene singletes, es decir, células únicas. **B.** Gráfico dot plot representativo de tamaño vs complejidad citoplasmática donde se define R2 que contiene a la población de macrófagos. **C.** Histograma representativo del porcentaje de macrófagos que están asociados con al menos una bacteria (macrófagos FITC+). **D.** Histograma representativo del porcentaje de macrófagos totales (Gate en R2) o macrófagos FITC+ (Gate en R3) que producen ROS.

Luego de realizar el análisis, se evidenciaron diferencias en el porcentaje de macrófagos con bacterias asociadas (macrófagos FITC+ con bacterias intracelulares o adheridas a su superficie) cuando fueron enfrentados con ambas cepas ($p=0,041$); siendo mayor el porcentaje para la cepa 5011 (P) (83,75%) en comparación con la 806 (T) (72,23%) (Figura 26 A). El parámetro de IFM (cantidad de bacterias promedio asociada

por macrófago) también difirió ($p=0,026$), siendo mayor para los macrófagos enfrentados con la cepa 5011 (P) en comparación con la cepa 806 (T) (Figura 26 B).

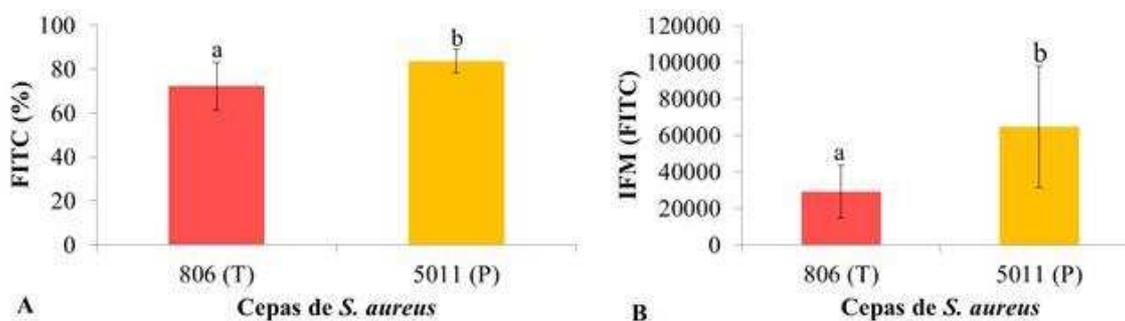


Figura 26. A. Porcentajes promedio de macrófagos FITC+ conteniendo al menos una bacteria asociada (adherida y/o internalizada) luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* marcados con FITC. **B.** Promedio de la IFM de macrófagos FITC+ luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* marcadas con FITC. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p<0,05$). FITC: Isotiocinato de fluoresceína. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

No se observaron diferencias en la producción de ROS (células HE positivas) por parte de los macrófagos enfrentados a las cepas 5011 (T) y 806 (P) de *S. aureus* ($p=0,24$, Figura 27 A) y tampoco se evidenciaron diferencias en la cantidad de ROS promedio producida por célula, evaluado por el parámetro de IFM ($p=0,86$, Figura 27 B).

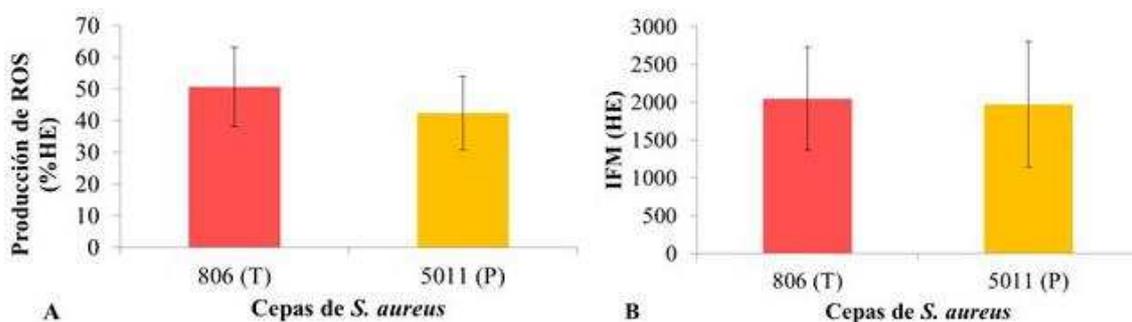


Figura 27. A. Porcentajes promedio de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) en macrófagos luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* marcadas con FITC. **B.** Promedio de la IFM de la producción de ROS en macrófagos luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* marcadas con FITC. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a

tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$). HE: Hidroetidina. IFM: Intensidad de fluorescencia media. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

Por otra parte, se realizó el análisis de la producción de ROS intracelular de los macrófagos infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y que luego del co-cultivo estuvieron asociados con al menos una bacteria (macrófagos FITC+), observándose un incremento en la producción de ROS en los macrófagos FITC + infectados con la cepa 5011 (P) en comparación con la cepa 806 (T) ($p = 0,029$) (Figura 28 A). Sin embargo, la IFM de los macrófagos FITC + que produjeron ROS fue similar para ambas cepas evaluadas ($p = 0,34$) (Figura 28 B).

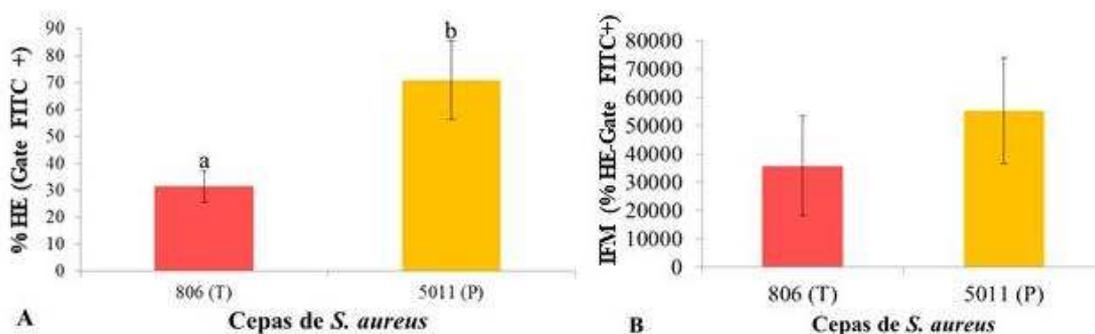


Figura 28. A. Porcentajes promedio de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la población de macrófagos FITC+, que estuvieron en contacto con al menos una bacteria, luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus*. **B.** Promedio de la IFM para la producción de ROS intracelular en la población de macrófagos FITC+ luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus*. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$). HE: Hidroxietidina. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

4.15. Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* de inducir la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos.

Cuando se enfrentó a los macrófagos con ambas cepas de *S. aureus* marcadas con FITC, la producción de nitritos (formados por la espontánea oxidación del ON) fue

similar a la producción basal (macrófagos cultivados con medio solamente). La estimulación del macrófago con PMA/Io (control positivo de activación) indujo un aumento significativo en la producción de nitritos en comparación con la producción basal y con la obtenida luego del desafío con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* ($p < 0,05$) (Figura 29).

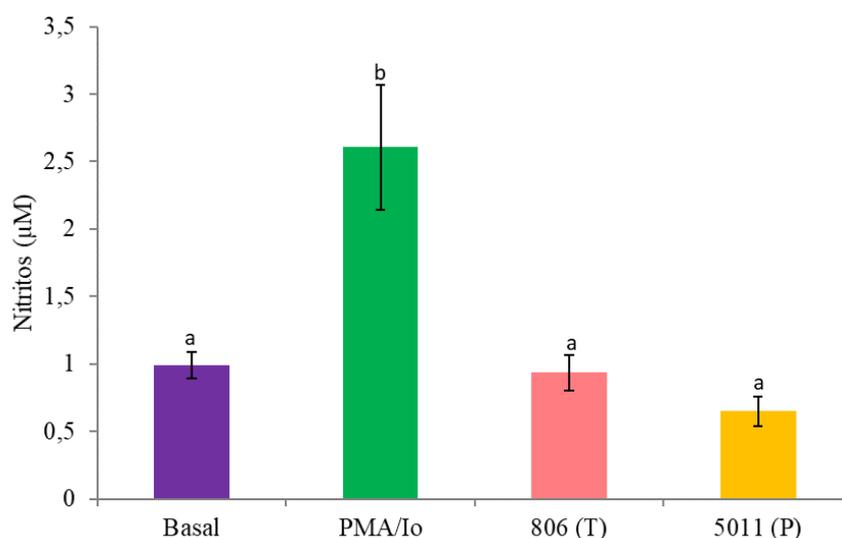


Figura 29. Concentración de nitritos (generados por la espontánea oxidación del ON) producidos por macrófagos de secreción mamaria luego del co-cultivo con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus*. Las barras representan las medias \pm desvío estándar (DE) correspondientes a tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$). Basal: Macrófagos no infectados. PMA/Io (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate/Ionicina): Macrófagos de secreción mamaria estimulados con PMA e Ionicina, control positivo para la producción de ON. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

4.16. Evaluación de la persistencia intracelular de las cepas de *S. aureus* en macrófagos.

Se evaluó la persistencia intracelular de las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* en macrófagos bovinos purificados a partir de secreción mamaria. Los resultados mostraron que no se pudieron recuperar bacterias viables del lisado de los macrófagos enfrentados con las dos cepas de *S. aureus* en ninguno de los tiempos evaluados (2, 4, 8 y 24 hs pi).

4.16.1. Evaluación de la viabilidad intracelular de cepas de *S. aureus* en macrófagos.

Se evaluó por microscopía de fluorescencia la viabilidad de las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* en el interior de los macrófagos de secreción mamaria a las 2 y 4 hs pi.

Como se observa en la figura 30, a las 2 hs pi se pudo identificar la presencia de bacterias vivas (marcadas con Syto9) en el citoplasma de macrófagos que fueron enfrentados a ambas cepas de *S. aureus*; observándose una mayor densidad de bacterias fagocitadas en los macrófagos enfrentados con la cepa 5011 (P) (Figura 30C) en comparación con la cepa 806 (T) (Figura 30 A). Se observaron bacterias positivas a IP a las 2 y 4 hs pi tanto para la cepa T (Figura 30 B) como para la P (Figura 30 D).

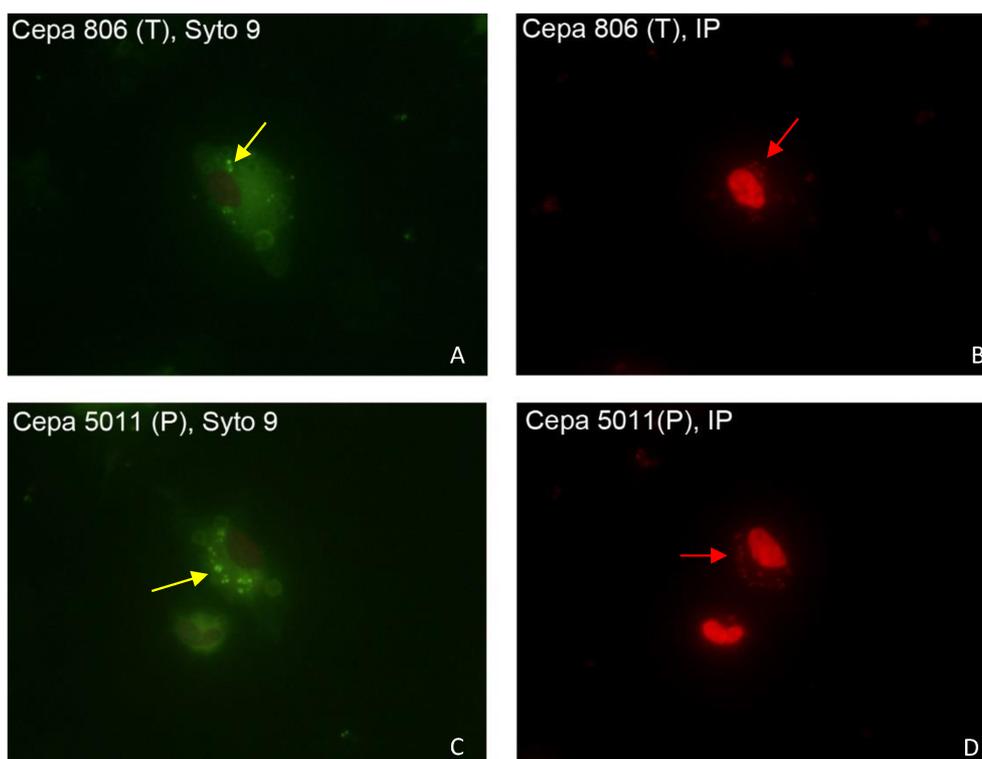


Figura 30. Microscopía de fluorescencia en macrófagos a las 2 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (1000x). **A y C.** Las flechas amarillas indican bacterias fagocitadas, marcadas con Syto9 (fluorescencia verde), en el citoplasma de los macrófagos. Se observa mayor densidad de bacterias marcadas con Syto9 en los macrófagos infectados con la cepa 5011 (P) en comparación con la cepa 806 (T). **B y D.** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propidio (IP) (fluorescencia

roja) en el citoplasma de los macrófagos. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

Como se observa en la figura 31 C, a las 4 hs pi se pudo identificar la presencia de bacterias vivas (marcadas con Syto9) en el citoplasma de macrófagos que fueron enfrentados a la cepa 5011 (P) de *S. aureus*. En este mismo tiempo del co-cultivo, no fue posible detectar la presencia de bacterias marcadas con Syto9 en los macrófagos enfrentados a la cepa 806 (T) (Figura 31 A). En ambos tiempos pi se identificaron bacterias muertas (marcadas con IP) en el citoplasma de los macrófagos enfrentados con las dos cepas en estudio (Figura 31 B y D).

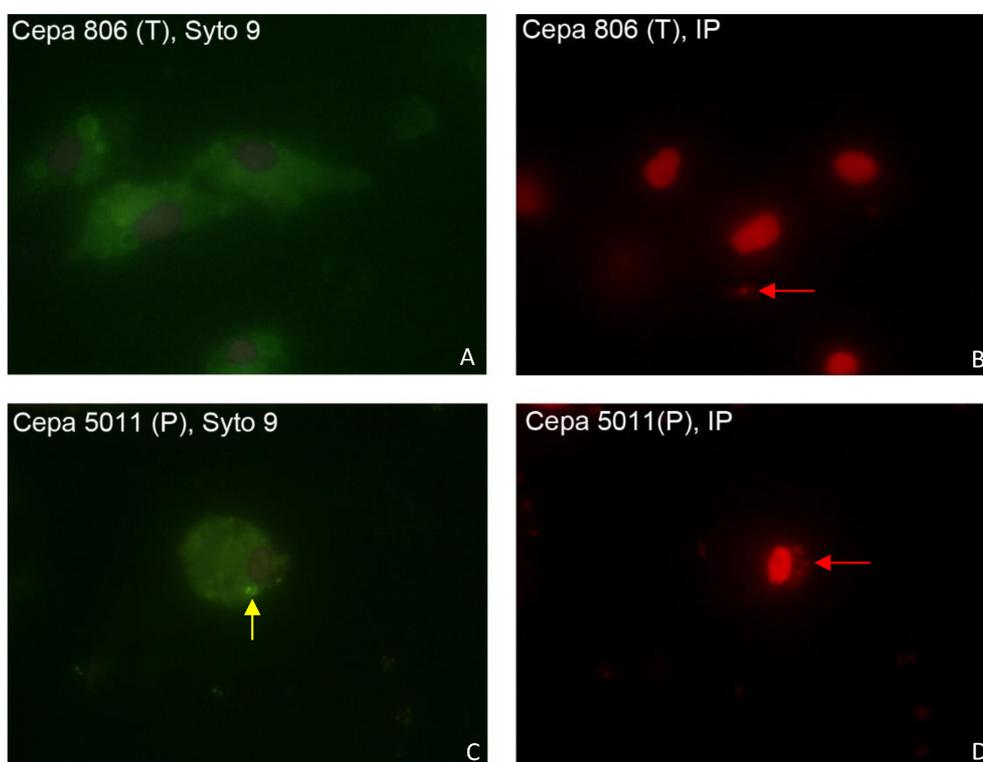


Figura 31. Microscopía de fluorescencia en macrófagos a las 4 hs post-infección con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* (1000x). **A.** Macrófagos infectados con la cepa 806 (T), en los cuales no fue posible detectar la presencia de bacterias marcadas con Syto9. **C:** La flecha amarilla indica bacterias fagocitadas, marcadas con Syto 9 (fluorescencia verde), en el citoplasma de los macrófagos infectados con la cepa 5011 (P). **B y D.** Las flechas rojas indican bacterias marcadas con Ioduro de propidio (IP) (fluorescencia roja) en el citoplasma de los macrófagos infectados con ambas cepas de *S. aureus*. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente.

Para cumplir con el **objetivo específico 3.2.3** se realizaron los ensayos comprendidos en los ítems del punto 4.17.

4.17. Puesta a punto de la infección experimental en la glándula mamaria bovina.

El animal restante fue inoculado con solución fisiológica estéril en el cuarto AD y utilizado como control. Los animales fueron seleccionados según lo descrito en el punto 3.3.2.

A las 12 y 24 hs post-i, en el cuarto mamario desafiado con la cepa 806 (T), no se observaron cambios macroscópicos en la leche ni tampoco signos de inflamación aparentes. A las 48 y 72 hs post-i, se observó la presencia de grumos en la leche sin signos de inflamación aparente en el cuarto inoculado con esta cepa de *S. aureus*. El aislamiento bacteriano a partir de leche del cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) fue positivo a las 48 y 72 hs post-i y las colonias fueron identificadas como *S. aureus* por pruebas estándares.

En las muestras de leche del cuarto mamario inoculado con la cepa 5011 (P) no fue posible el aislamiento bacteriano en ninguno de los tiempos de muestreo, no se observaron cambios macroscópicos en la leche ni signos de inflamación aparentes.

En las muestras de leche del cuarto mamario inoculado con solución fisiológica no se aislaron microorganismos en ninguno de los tiempos de muestreo, no se observaron cambios macroscópicos en la leche ni signos de inflamación aparentes.

En la figura 32 se muestra el RCS de los cuartos mamarios inoculados con la cepa 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y del cuarto control inoculado con solución fisiológica desde la hora 0 (pre-i) hasta las 120 hs post-i.

En el cuarto inoculado con la cepa 806 (T) se observó un pico en el RCS de la leche a las 48 hs post-i, alcanzando valores de $8,2 \times 10^6$ cél/ml (Log_{10} 6,91), para descender gradualmente hasta las 120 hs post-i. En el cuarto mamario inoculado con la cepa 5011 (P) el incremento en el RCS de la leche fue gradual, alcanzando valores máximos de $1,3 \times 10^6$ cél/ml (Log_{10} 6,10) a las 96 hs post-i, aunque éstos fueron menores a los observados para la cepa 806 (T). En los cuartos mamarios controles inoculados con solución fisiológica, no se observaron variaciones en los RCS en leche durante los tiempos de muestreo evaluados.

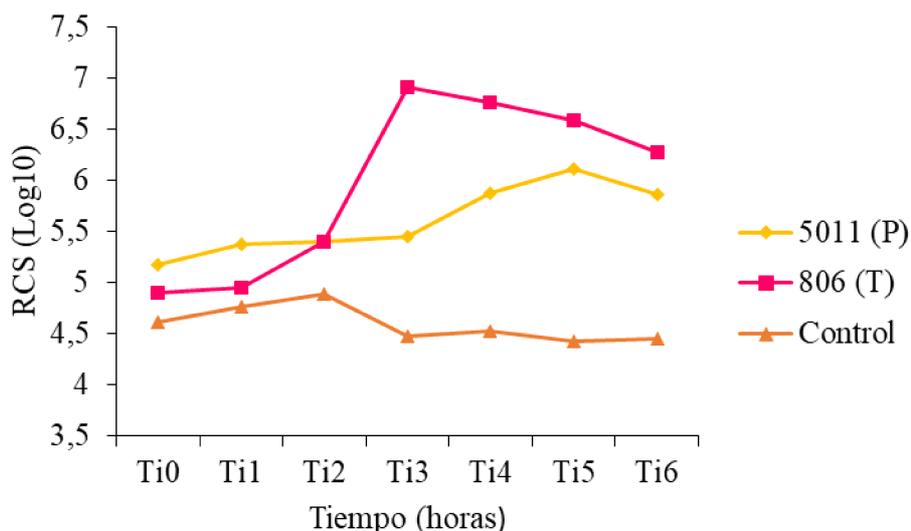


Figura 32. Recuento de células somáticas (Log10) en los cuartos mamarios inoculados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica desde la hora 0 (pre-i) hasta las 120 hs post-i. Ti0: tiempo 0 pre-inoculación (pre-i); Ti1: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti2: 24 hs post-i; Ti3: 48 hs post-i; Ti4: 72 hs post-i; Ti5: 96 hs post-i; Ti6: 120 hs post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica.

Para cumplir con el **objetivo específico 3.2.4** se realizaron los ensayos comprendidos en los ítems del punto 4.18.

4.18. Resultados preliminares de la infección experimental de la glándula mamaria bovina con cepas T y P de *S. aureus*.

4.18.1. Monitoreo de la infección intramamaria.

Para los desafíos experimentales se seleccionaron 6 vacas. Un animal fue desafiado con la cepa 806 (T) en los cuartos (AD) y (PI) y 2 animales fueron desafiados con la cepa 5011 (P) en los cuartos (AD) y (PI). Por otra parte, 3 animales fueron inoculados con solución fisiológica en los cuartos AD y PI como controles. El seguimiento de la inoculación experimental se realizó mediante la toma de muestras de leche y sangre desde la hora 0 (pre-i) hasta los 21 días post-i.

En el cuarto AD desafiado con la cepa 806 (T) se observaron grumos en la leche a las 24, 48 y 72 hs y a los 7 días post-i, sin signos inflamatorios aparentes en el cuarto inoculado. El cuarto PI desafiado con la cepa 806 (T), a las 24 hs post-i, desarrolló una mastitis clínica con la presencia de grumos en la leche y signos inflamatorios en el cuarto inoculado (calor y tumefacción). El cuarto afectado fue tratado con cloxacilina – ampicilina intramamaria (Cloxampi M.A., ZOOVET) cada 12 hs durante 4 días, por lo tanto, debió ser excluido del ensayo.

De los dos animales desafiados con la cepa 5011 (P), solo se observaron pequeños grumos en la leche en el cuarto (PI) en uno de los animales a los 14 días post-i, sin la presencia de signos inflamatorios locales.

En los cuartos mamarios de los 3 animales inoculados con solución fisiológica no se observaron cambios macroscópicos en la leche ni signos de inflamación aparentes en ninguno de los periodos de muestreo evaluados.

4.18.1.1. Recuentos de células somáticas.

Se evaluaron los RCS en leche para cada tiempo de muestreo en los cuartos mamarios desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles desafiados con solución fisiológica (Figura 33).

En el cuarto AD inoculado con la cepa 806 (T) se observó un pico en el RCS de la leche a las 48 hs post-i, alcanzando valores de $7,96 \times 10^6$ cél/ml (Log_{10} 6,90). A partir del día 7 post-i se observó un descenso marcado en el RCS ($3,02 \times 10^6$ cél/ml; Log_{10} 6,48), para alcanzar al día 21 post-i valores de $4,63 \times 10^5$ cél/ml (Log_{10} 5,66).

En los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) no se observaron variaciones en los valores de RCS de la leche hasta las 72 hs post-i. A las 96 hs post-i se observó un incremento en el RCS, el cual se mantuvo hasta los 7 días post-i, alcanzando los máximos valores a los 14 días post-i ($3,84 \times 10^6$ cél/ml; Log_{10} 6,48). A los 21 días post-i los valores de los RCS en los cuartos inoculados se mantuvieron elevados ($3,58 \times 10^6$ cél/ml; Log_{10} 6,4).

Los cuartos de los animales controles, inoculados con solución fisiológica, no mostraron variaciones en los RCS a lo largo del ensayo.

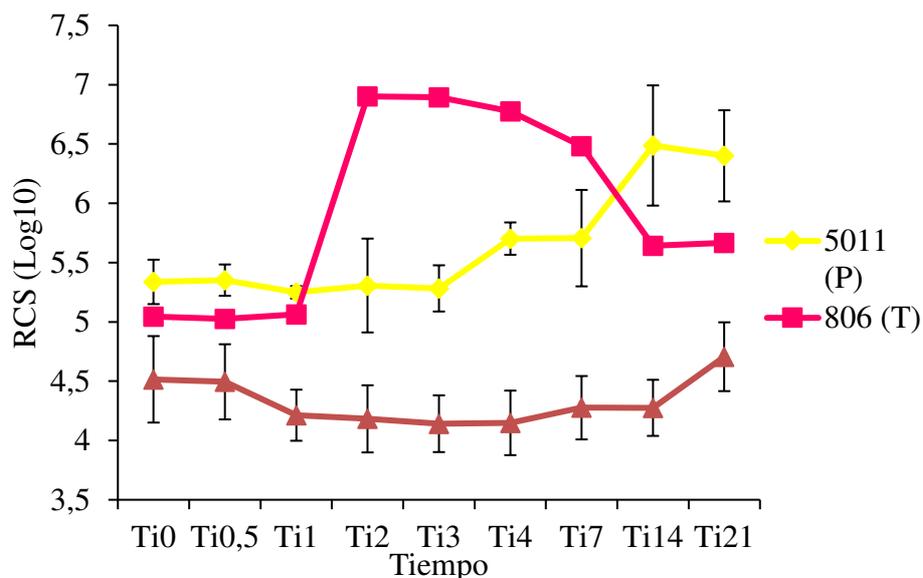


Figura 33. Recuento de células somáticas (Log10) en los cuartos desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica.

4.18.1.2. Aislamiento microbiológico a partir de leche.

A partir de la leche proveniente del cuarto AD (animal 1) desafiado con la cepa 806 (T), fue posible el aislamiento de colonias de 3-4 mm de diámetro, amarillentas, con doble halo de hemólisis a las 24 (5000 UFC/ml), 48 (1500 UFC/ml) y 72 hs (500 UFC/ml) post-i. A las 96 hs y a los 7 días post-i, el cultivo microbiológico de la leche fue negativo; mientras que a los 14 y a los 21 días post-i el aislamiento fue positivo (100 UFC/ml y 300 UFC/ml, respectivamente). En estos últimos periodos, la morfología de las colonias fue similar a aquellas halladas durante los primeros 3 días post-i. Las pruebas bioquímicas realizadas confirmaron la presencia de *S. aureus* en el cuarto mamario inoculado. En el cuarto PI (animal 1) desafiado con la cepa 806 (T), a las 24 hs post-i se aislaron dos tipos de colonias con diferente morfología. Por un lado, 2.700 UFC/ml, las colonias median 3-4 mm de diámetro, amarillentas y con doble halo de hemólisis y por otro, más de 10.000 UFC/ml con colonias pequeñas (<1 mm), grisáceas con ausencia de hemólisis. Estas

últimas bacterias fueron identificadas como cocos Gram (+) y no mostraron reacción a la prueba de la catalasa. El cuarto PI fue tratado con antibióticos intramamarios durante 4 días por lo tanto fue excluido del ensayo. Finalizado el ensayo (21 días post-i), y a los fines de realizar un seguimiento de la IIM, se tomaron muestras de leche para cultivo microbiológico de los cuartos AD y PI inoculados con la cepa 806 (T) durante 5 semanas con intervalos de 7 días, no detectándose desarrollo bacteriano en ninguno de los muestreos realizados. El cultivo microbiológico de la leche obtenida del cuarto mamario AD (animal 2) desafiado con la cepa 5011 (P) no mostró desarrollo bacteriano en ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, el cultivo de la leche del cuarto PI (animal 2) mostró desarrollo de colonias de 4-5 mm de diámetro, ligeramente amarillentas y con doble halo de hemólisis a los 7 (200 UFC/ml) y 14 días (400 UFC/ml colonias) post-i. Las pruebas bioquímicas realizadas confirmaron la presencia de *S. aureus* en el cuarto mamario inoculado en ambos tiempos de muestreo.

El cultivo microbiológico a partir de leche del cuarto AD (animal 3) inoculado con la cepa 5011 (P) mostró desarrollo bacteriano a los 14 días post-i (300 UFC/ml). Mientras que el cultivo de leche del cuarto PI (animal 3) mostró desarrollo bacteriano a los 14 (400 UFC/ml) y 21 días (200 UFC/ml) post-i. La morfología de las colonias fue similar a la observada en el cultivo de leche del cuarto PI (animal 2) y las pruebas bioquímicas confirmaron la presencia de *S. aureus*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22. Se almacenaron muestras de las cepas que se aislaron en cada tiempo evaluado para posterior caracterización por PFGE, lo cual se realizará posteriormente porque excede a los objetivos de esta tesis.

Finalizado el ensayo (21 días post-i), y a los fines de realizar un seguimiento de la IIM, se tomaron muestras de leche para cultivo microbiológico de los cuartos AD y PI (animal 2 y 3) inoculados con la cepa 5011 (P) durante 5 semanas con intervalos de 7 días. En el cuarto PI (animal 2) se observó desarrollo de colonias de *S. aureus* (confirmado por pruebas bioquímicas) a los 28 días y a los 42 días post-i. En el cuarto AD (animal 3) se observó desarrollo de colonias de *S. aureus* (confirmado por pruebas bioquímicas) a los 28 y 49 días post-i y en el cuarto PI (animal 3) a los 28, 35 y 56 días post-i.

Los cultivos microbiológicos a partir de leche de los cuartos AD y PI de los animales controles no mostraron desarrollo bacteriano en ninguno de los tiempos de muestreo evaluados.

Tabla 22. Aislamiento microbiológico a partir de leche de cuartos mamarios desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* a diferentes tiempos post-inoculación.

Cepa (animal - cuarto inoculado)	Ti0	Ti0,5	Ti1	Ti2	Ti3	Ti4	Ti7	Ti14	Ti21
806 (Animal 1 - AD)	-	-	+	+	+	-	-	+	+
5011 (Animal 2 - AD)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5011 (Animal 2 - PI)	-	-	-	-	-	-	+	+	-
5011 (Animal 3 - AD)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
5011 (Animal 3 - PI)	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. AD: cuarto anterior derecho. PI: cuarto posterior izquierdo. (+): Cultivo microbiológico positivo a *S. aureus*. (-) Cultivo microbiológico negativo a *S. aureus*.

4.18.2. Evaluación de la respuesta inmune en leche.

La respuesta inmune de la glándula mamaria se determinó a partir de leche de cuartos infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica en los tiempos T 0 pre-i, Ti 0,5, Ti 1, Ti 2, Ti 3, Ti 4, Ti 7, Ti 14 y Ti 21 días post-i. Se evaluó la producción de ON mediante la reacción de Griess, la concentración de diferentes citoquinas (IL-1 β , IL-6 e IL-4) mediante kits de ELISA comerciales y los niveles de IgG específicos. Por otra parte, se determinó la dinámica de las poblaciones celulares en sangre (monocitos, linfocitos T CD4 y T CD8, linfocitos B y linfocitos T $\gamma\delta$) mediante citometría de flujo.

4.18.2.1. Evaluación de la producción de ON.

Se evaluó la concentración de ON en muestras de leche provenientes de animales infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y animales controles inoculados con solución fisiológica en los diferentes tiempos de muestreo. Como se puede observar en la figura 34, en el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) de *S. aureus* se observó un aumento en la concentración de nitritos (formados por la espontánea oxidación del ON) desde las 12 hs post-i, alcanzando un máximo a las 48 hs post-i. A partir de las 96 hs post-i se observó un marcado descenso en la concentración de nitritos alcanzando valores indetectables hasta el final del ensayo. Por otra parte, en los cuartos

mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) no se observaron variaciones en los valores de nitritos hasta el día 7 post-i. Al día 14 post-i se observó un incremento en los niveles de nitritos alcanzando el máximo valor al día 21 post-i. Los cuartos de los animales controles, inoculados con solución fisiológica, no mostraron variaciones en los niveles de nitritos a lo largo del ensayo.

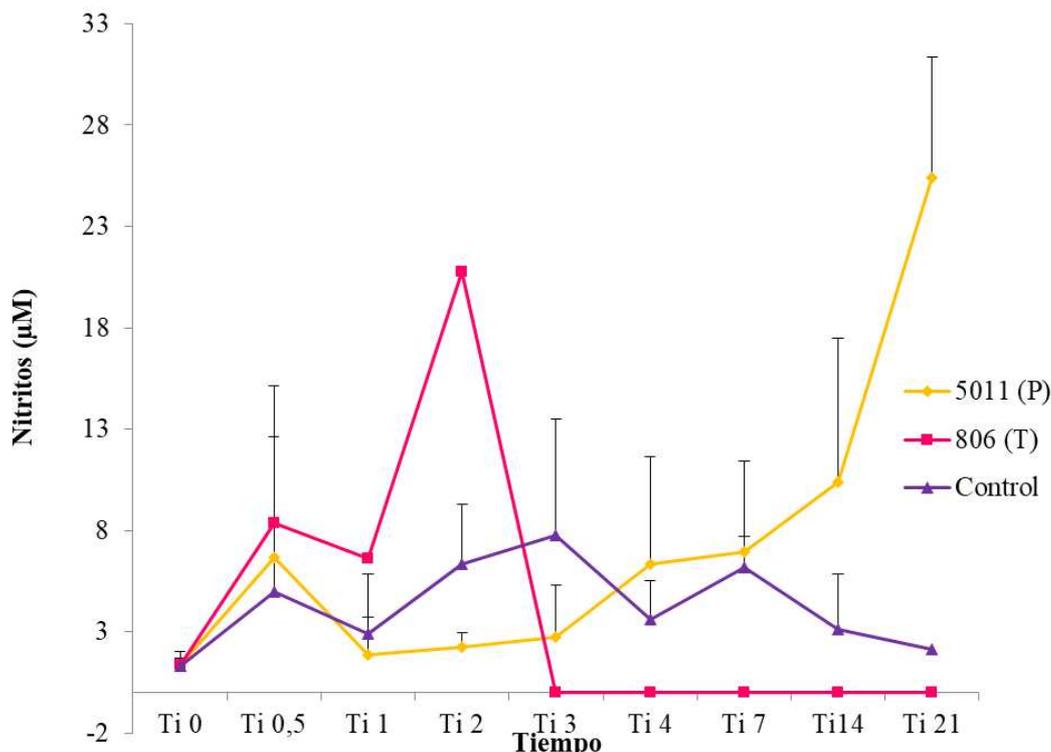


Figura 34. Concentración de nitritos en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica.

4.18.2.2. Cuantificación de los niveles de citoquinas en muestras de leche.

4.18.2.2.1. IL-1 β .

En el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) de *S. aureus* se observó un aumento en la concentración de IL-1 β desde las 24 hs hasta las 48 hs post-i, alcanzando en este tiempo la concentración máxima. A partir de las 72 hs post-i se observó un marcado descenso de los niveles de esta citoquina, para alcanzar valores indetectables el resto de los tiempos evaluados. Por otra parte, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron variaciones en la concentración de IL-1 β , encontrándose valores similares a los detectados en los cuartos controles inoculados con solución fisiológica en los diferentes tiempos de muestreo evaluados (Figura 35).

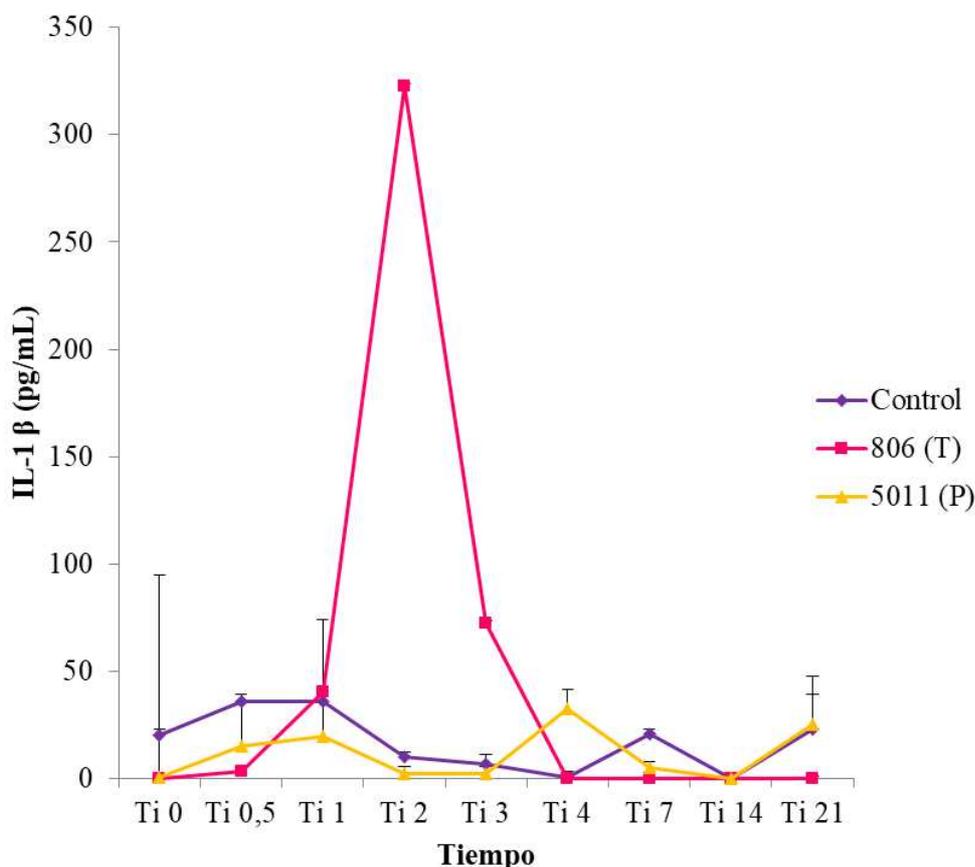


Figura 35. Concentración de IL-1 β (pg/mL) en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica.

4.18.2.2.2. IL-6.

En el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) de *S. aureus* se observó un aumento en la concentración de IL-6 a las 24 hs post-i hasta las 48 hs post-i alcanzando en este tiempo la concentración máxima. A partir de las 72 hs post-i se observó un marcado descenso de los niveles de esta citoquina, para alcanzar valores indetectables el resto de los tiempos evaluados. Por otra parte, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se detectaron variaciones en los escasos niveles de IL-6 observados, encontrándose valores similares a los hallados en los cuartos controles inoculados con solución fisiológica en los diferentes tiempos de muestreo evaluados (Figura 36).

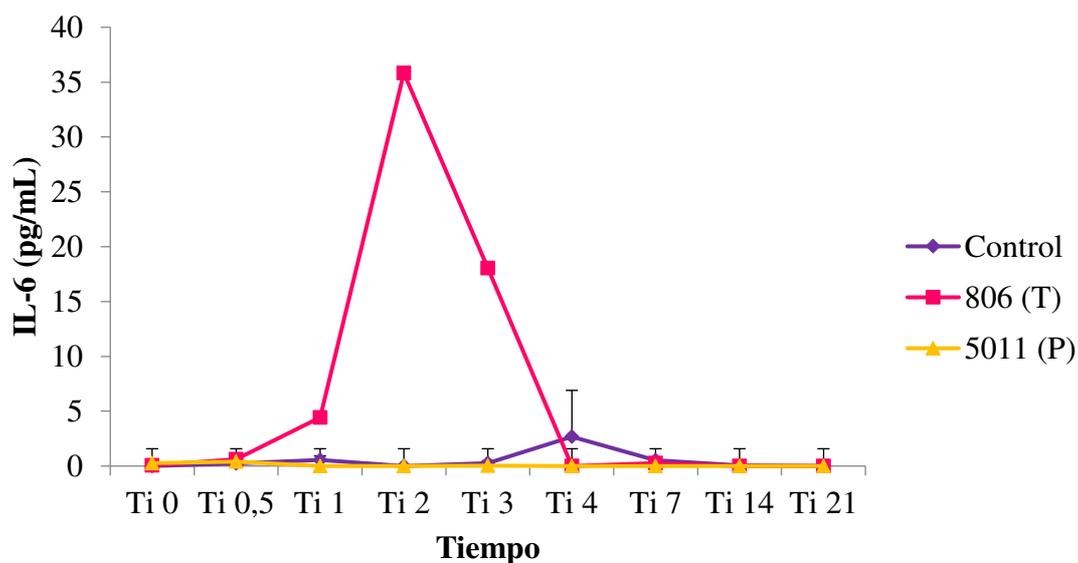


Figura 36. Concentración de IL-6 (pg/mL) en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica.

4.18.2.2.3. IL-4.

En el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) de *S. aureus* los niveles de IL-4 fueron prácticamente indetectables y se mantuvieron sin modificaciones a lo largo del tiempo de muestreo. Por otra parte, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, solo se detectaron niveles de IL-4 desde el tiempo 0 pre- i hasta las 24 hs post-i, encontrándose valores similares a los obtenidos en las muestras de leche provenientes de animales inoculados con solución fisiológica. A partir de las 48 hs post- i y hasta el día 21 post-i no se detectaron niveles de IL-4 en las muestras de leche provenientes de cuartos infectados con la cepa 5011 (T) de *S. aureus*. Los cuartos de los animales controles, inoculados con solución fisiológica, no mostraron variaciones en los niveles de IL-4 a lo largo del ensayo (Figura 37).

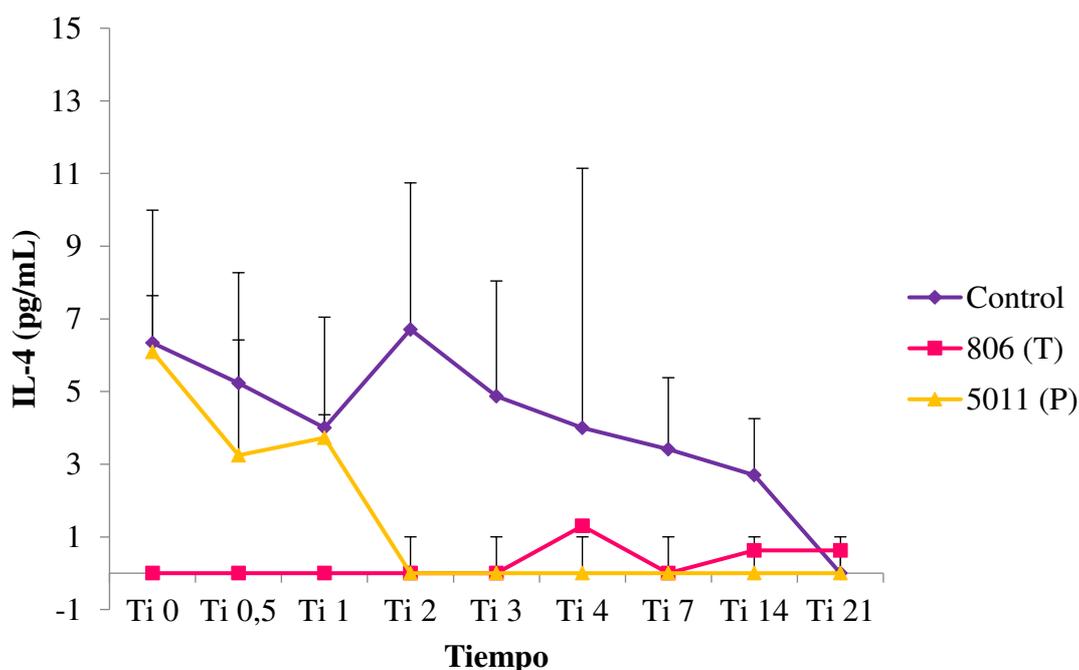


Figura 37. Concentración de IL-4 (pg/mL) en muestras de leche de cuartos de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y de animales controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Cuartos mamarios inoculados con solución fisiológica.

4.18.2.3. Evaluación de los niveles de IgG total en muestras de leche.

En la figura 38 se muestran los niveles de IgG total obtenidos cuando se utilizó un lisado de la cepa 806 (T) de *S. aureus* como antígeno para sensibilizar el pocillo de la placa. Como se puede observar en la figura, en el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) se observó un pico en los niveles de IgG total al día 7 post-i, que luego fue descendiendo al día 14 post-i y llegó al día 21 post-i a valores similares al tiempo 0 pre-i y a los valores de IgG obtenidos en cuartos controles inoculados con solución fisiológica. Por otra parte, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* no se observaron variaciones en los niveles de IgG total a lo largo del tiempo de muestreo, siendo estos superiores a los detectados en los cuartos controles inoculados con solución fisiológica. Por último, los cuartos de los animales controles no mostraron variaciones en los niveles de IgG total a lo largo del ensayo.

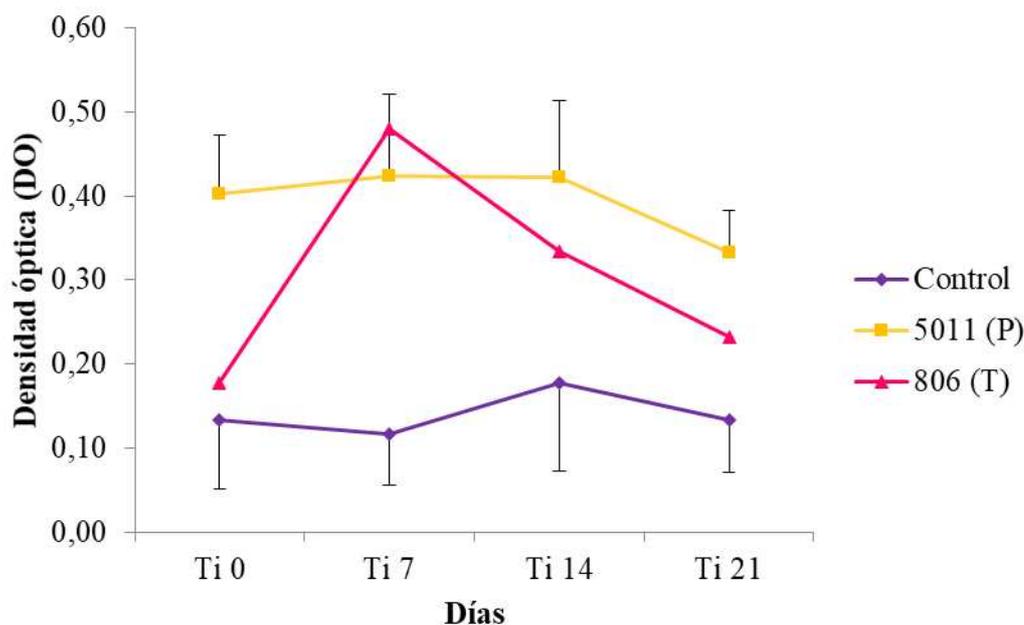


Figura 38. Niveles de IgG total en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y de controles inoculados con solución fisiológica. Placa sensibilizada con lisado de la cepa 806 (T). Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria; (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: animales inoculados con solución fisiológica.

En la figura 39 se muestran los niveles de IgG total obtenidos cuando se utilizó un lisado de la cepa 5011 (P) de *S. aureus* como antígeno para sensibilizar el pocillo de la placa. Como se puede observar en la figura, en el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) se observó un pico en los niveles de IgG total al día 7 post-i, que luego fue descendiendo al día 14 post-i y llegó al día 21 post-i a valores similares al tiempo 0 pre-i y a los valores de IgG obtenidos en cuartos controles inoculados con solución fisiológica. Por otra parte, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P) se observó un incremento en los valores de IgG total al día 7 post-i, que luego retomó a valores basales al día 14 post-i, para aumentar nuevamente al día 21 post-i. Por último, los cuartos de los animales controles no mostraron variaciones importantes en los niveles de IgG total a lo largo del ensayo.

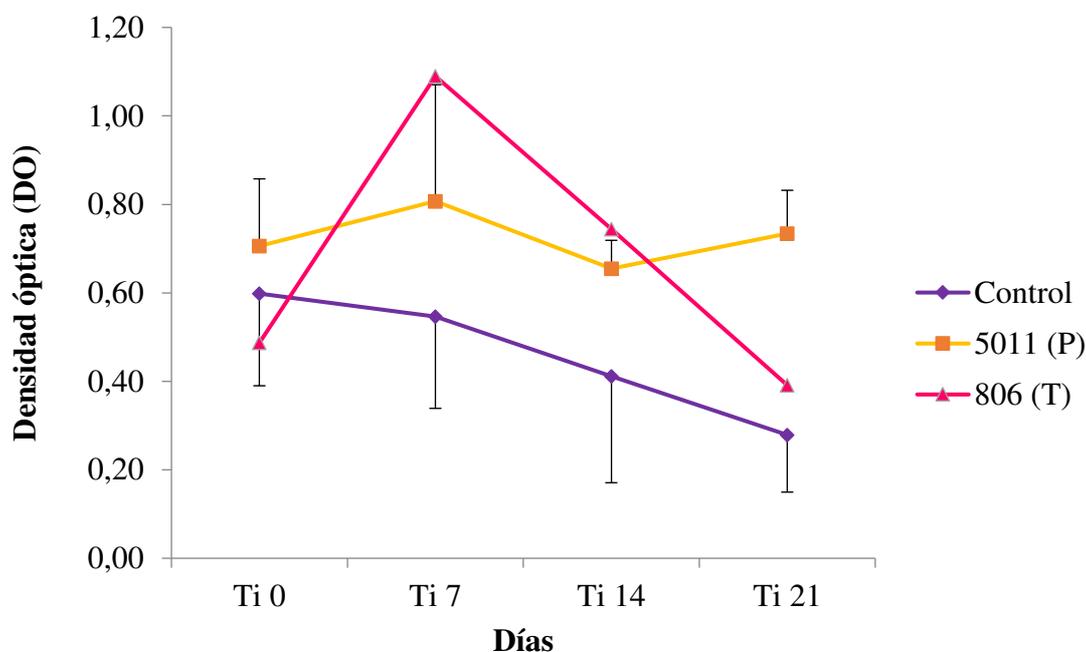


Figura 39. Niveles de IgG total en muestras de leche de cuartos provenientes de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica. Placa sensibilizada con lisado de la cepa 5011 (P). Para la cepa 5011 (P) y control, las líneas representan las medias \pm desvío estándar (DE). Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Animales inoculados con solución fisiológica.

4.18.3. Evaluación de dinámica de las poblaciones celulares en sangre.

A partir de muestras de sangre periférica provenientes de animales infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y de controles inoculados con solución fisiológica, durante diferentes tiempos de muestreo (T 0 pre-inoculación, Ti 0,5, Ti 1, Ti 2, Ti 3, Ti 4, Ti 7, Ti 14 y Ti 21 días post-i), se evaluaron las siguientes poblaciones inmunes: linfocitos B (CD21+), linfocitos TCD4 (CD3+ CD4+), linfocitos TCD8 (CD3+ CD8+), linfocitos T $\gamma\delta$ (WC1+) y monocitos (CD14+) mediante citometría de flujo. En la figura 40 se presenta la estrategia de “gating” utilizada para el análisis de las poblaciones celulares. El panel A de la figura muestra un gráfico representativo del tamaño de las poblaciones celulares donde se visualiza área vs altura para la selección de la población de “singletes” o células únicas contenidas en la región R1. En el panel B de la figura se observa un gráfico representativo de complejidad citoplasmática vs tamaño celular donde se definió la región R2 que contiene a la población de células mononucleares. Dentro de esta región se realizó el análisis de todas las poblaciones celulares antes mencionadas. El panel C de la figura muestra un gráfico representativo donde se analizó la expresión de CD21 (Li B) y CD14 (monocitos). El panel E de la figura muestra un histograma representativo de la expresión de CD3, donde se definió la región R3 que contiene a la población de linfocitos T totales. Dentro de esta región se realizó el análisis de la expresión de CD4 en función de la expresión de CD8 para identificar a los linfocitos TCD4 y TCD8 respectivamente (Panel F). El panel G de la figura muestra un gráfico representativo donde se analizó la expresión de WC1 que identifica a los linfocitos T $\gamma\delta$.

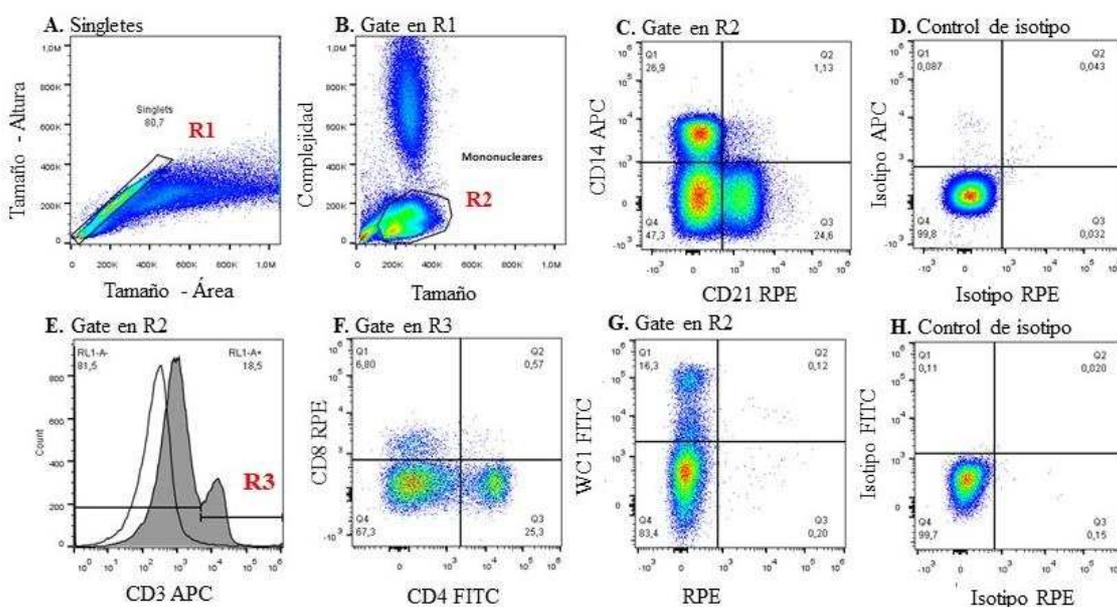


Figura 40. Estrategia de “gating” utilizada para el análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica. **A.** Selección de “singletes” o células únicas (R1). **B.** Selección de la población de células mononucleares (R2). **C.** Gráfico “Dot Plot” representativo de la frecuencia de células CD14 + (monocitos) y células CD21+ (Linfocitos B). **D.** Controles de isotipo y fluorocromos para APC (Allophycocyanin) y RPE (ficoeritrina). **E.** Histograma representativo de la población de células CD3+ (Linfocitos T totales) a partir de la cual se realizó el análisis para las dos subpoblaciones CD4 y CD8 (R3). La línea negra representa la marcación con el control de isotipo y el histograma gris representa la fluorescencia de células CD3 positivas. **F.** Gráfico “Dot Plot” representativo de la frecuencia de linfocitos TCD4 y TCD8. **G.** Gráfico “Dot Plot” representativo de la frecuencia de células WC1+ (Linfocitos T $\gamma\delta$). **H.** Control de isotipo y fluorocromo para FITC y RPE.

4.18.3.1. Evaluación de la población de monocitos en sangre periférica.

En la figura 41 se muestran los porcentajes de monocitos de sangre periférica provenientes de animales infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y animales controles inoculados con solución fisiológica desde el día 0 pre-i hasta el día 21 post-i. Como se puede observar en la figura, en el animal infectado con la cepa 806 (T) de *S. aureus*, el porcentaje de monocitos disminuyó notablemente a las 24 hs y 48 hs post-i. Luego de esta disminución en sangre periférica, los porcentajes de monocitos alcanzaron nuevamente valores cercanos al tiempo 0 pre-i. Al día 7 post-i se observó una disminución en el porcentaje de estas células, pero sin alcanzar los valores obtenidos a las 24 y 48 hs post-i. Finalmente, durante los días 14 y 21 post-i, los porcentajes de estas células innatas en sangre periférica subieron nuevamente, pero sin alcanzar los valores iniciales (tiempo 0 pre-i). En los animales infectados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, el porcentaje de monocitos alcanzó un pico en sangre periférica a las 48 hs post-i, mientras que el resto de los tiempos evaluados se mantuvo sin demasiados cambios. En los animales controles inoculados con solución fisiológica, los porcentajes de monocitos en sangre periférica se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del ensayo.

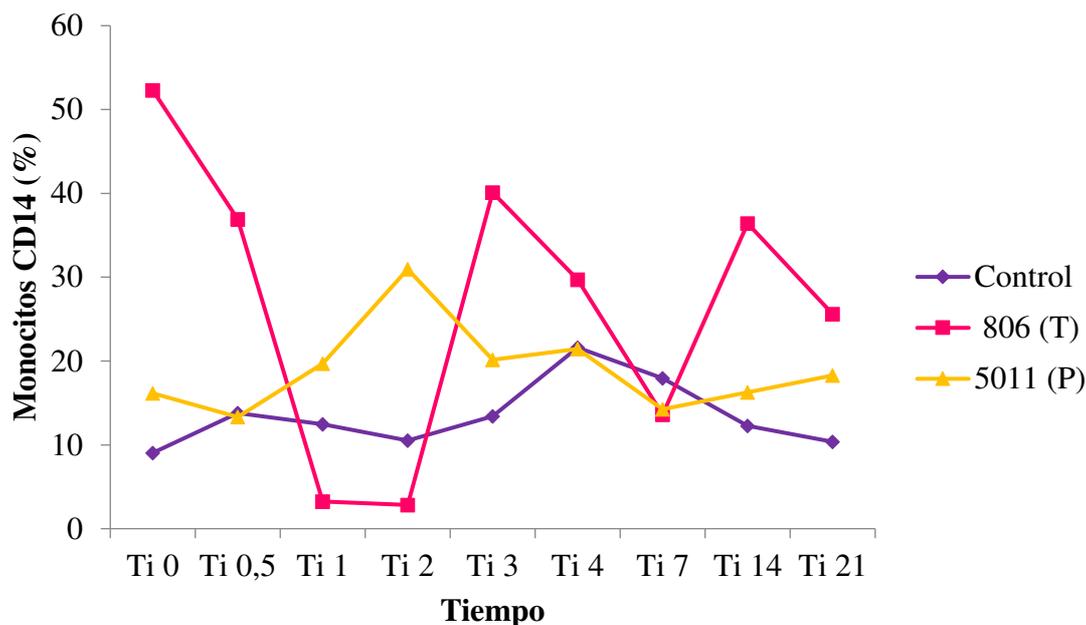


Figura 41. Porcentaje de monocitos en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: animales inoculados con solución fisiológica.

4.18.3.2. Evaluación de la población de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica.

En la figura 42 se muestran los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ de sangre periférica provenientes de animales infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y animales controles inoculados con solución fisiológica desde el día 0 pre-i hasta el día 21 post-i. Como se puede observar en la figura, en el animal infectado con la cepa 806 (T) de *S. aureus*, el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica fue disminuyendo desde el tiempo 0 pre-i hasta las 48 hs post-i, tiempo en el que se observó el menor porcentaje de estas células en sangre periférica. Luego de las 48 hs post-i, el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ fue aumentando hasta las 72 hs post-i para luego mantenerse hasta el día 21 post-i sin cambios. En los animales infectados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, el porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica fue mayor en todos los periodos de tiempos evaluados con respecto a los animales controles y al infectado con la cepa 806 de *S. aureus*. Al día 14 post-i se observó una disminución marcada en el porcentaje de estas células innatas en sangre periférica y al día 21 post-i alcanzó el mayor porcentaje en sangre periférica de todos los periodos evaluados. En los animales controles inoculados

con solución fisiológica, los porcentajes de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica se mantuvieron constantes a lo largo del ensayo.

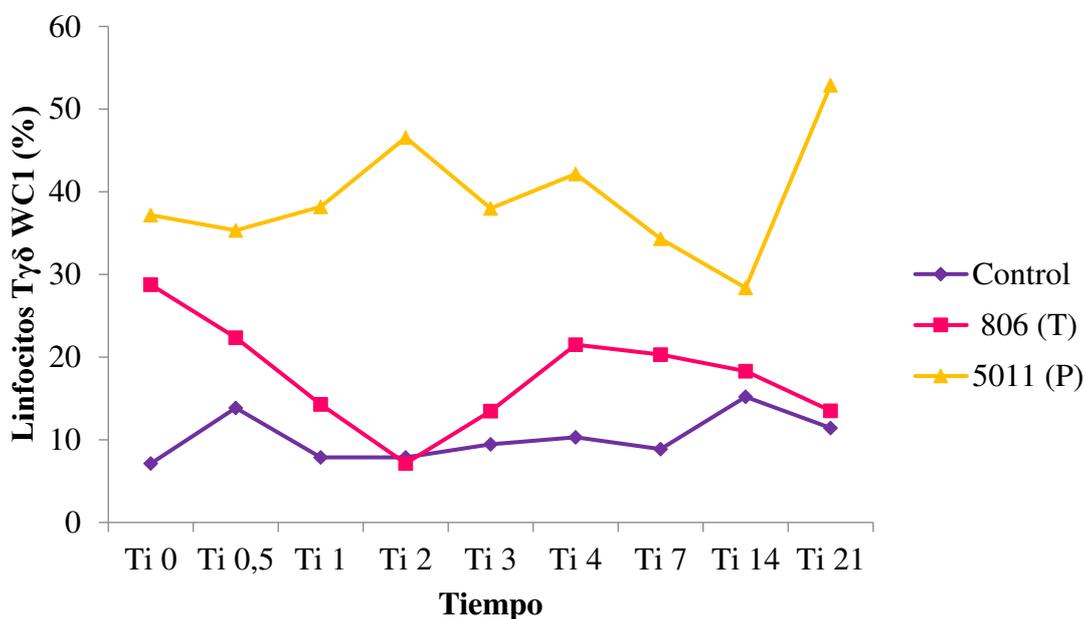


Figura 42. Porcentaje de linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. FITC: Isotiocianato de fluoresceína. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Animales desafiados con solución fisiológica.

4.18.3.3. Evaluación de la población de linfocitos B en sangre periférica.

En la figura 43 se muestran los porcentajes de linfocitos B de sangre periférica provenientes de animales infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y animales controles inoculados con solución fisiológica desde el día 0 pre-i hasta el día 21 post-i. Como se puede observar en la figura, en los animales infectados y controles los porcentajes de linfocitos B varían de manera similar durante los diferentes tiempos evaluados, mostrando los animales controles los mayores porcentajes de estas células inmunes en sangre periférica. La única diferencia que se puede observar es al día 21, donde la población de linfocitos B en los animales infectados con las cepas 806 (T) y

5011 (P) de *S. aureus* disminuye en sangre periférica, mientras que en los animales controles aumenta.

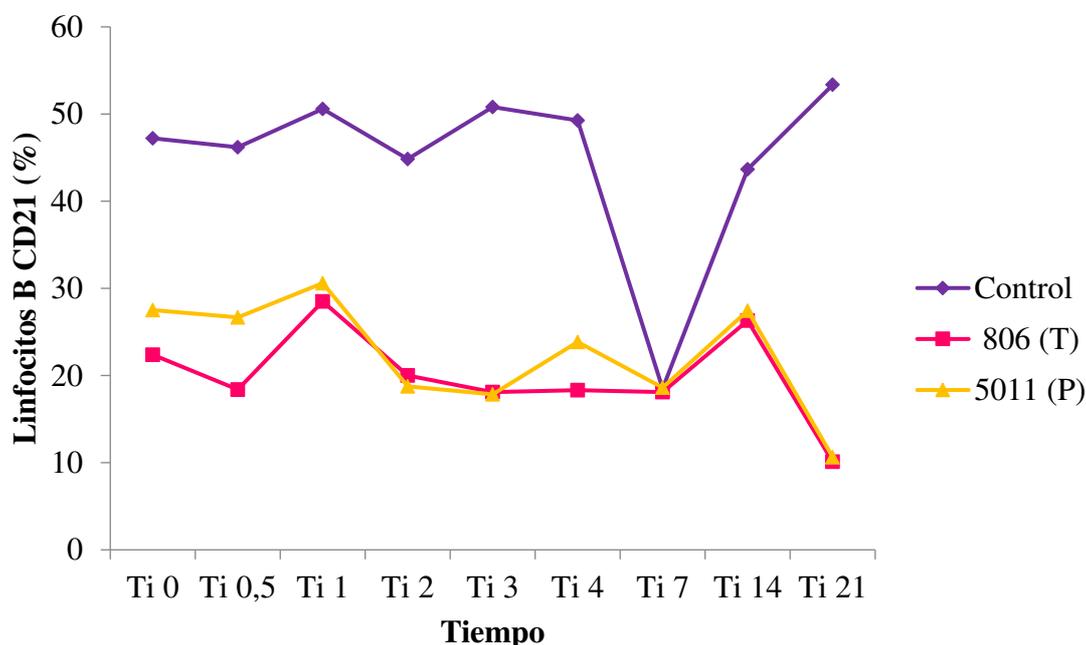


Figura 43. Porcentaje de linfocitos B en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Animales inoculados con solución fisiológica.

4.18.3.4. Evaluación de la población de linfocitos T CD8 en sangre periférica.

Como se puede observar en la figura 44, en el animal infectado con la cepa 806 (T) de *S. aureus*, el porcentaje de linfocitos TCD8 disminuye gradualmente en sangre periférica hasta las 96 hs post-i, tiempo en el que se observa el menor porcentaje de estas células inmunes en sangre periférica. A partir del día 7 post-i el porcentaje de linfocitos TCD8 aumentó nuevamente a valores similares a los encontrados a nivel basal (tiempo 0 pre-i). En los animales infectados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, el máximo porcentaje de linfocitos TCD8 de sangre periférica se observó al día 14 post-i. En los animales

controles, el porcentaje de linfocitos TCD8 de sangre periférica se mantuvo constante a lo largo del ensayo.

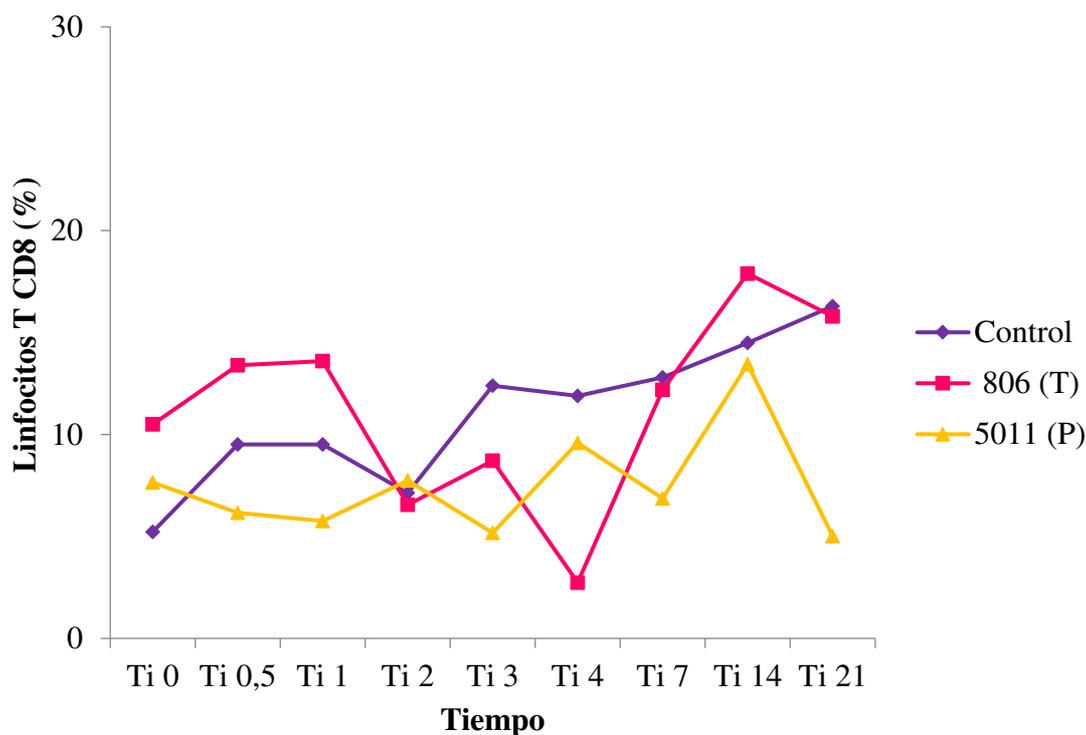


Figura 44. Porcentaje de linfocitos T CD8 en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Animales inoculados con solución fisiológica.

4.18.3.5. Evaluación de la población de linfocitos T CD4 en sangre periférica.

Como se puede observar en la figura 45, en el animal infectado con la cepa 806 (T) de *S. aureus*, el porcentaje de linfocitos TCD4 en sangre periférica fue mayor en todos los periodos de tiempos evaluados y a las 72 hs post-i se observó el mayor porcentaje de estos linfocitos en sangre periférica. En los animales infectados con la cepa 5011 (P) de *S. aureus*, el porcentaje de linfocitos TCD4 en sangre periférica fue menor en todos los periodos de tiempos evaluados, y a las 48 hs y al día 21 post-i se observaron los menores

porcentajes de estas células en sangre periférica. En cambio, en los animales controles inoculados con solución fisiológica, los porcentajes de linfocitos TCD4 en sangre periférica se mantuvieron constantes a lo largo del ensayo.

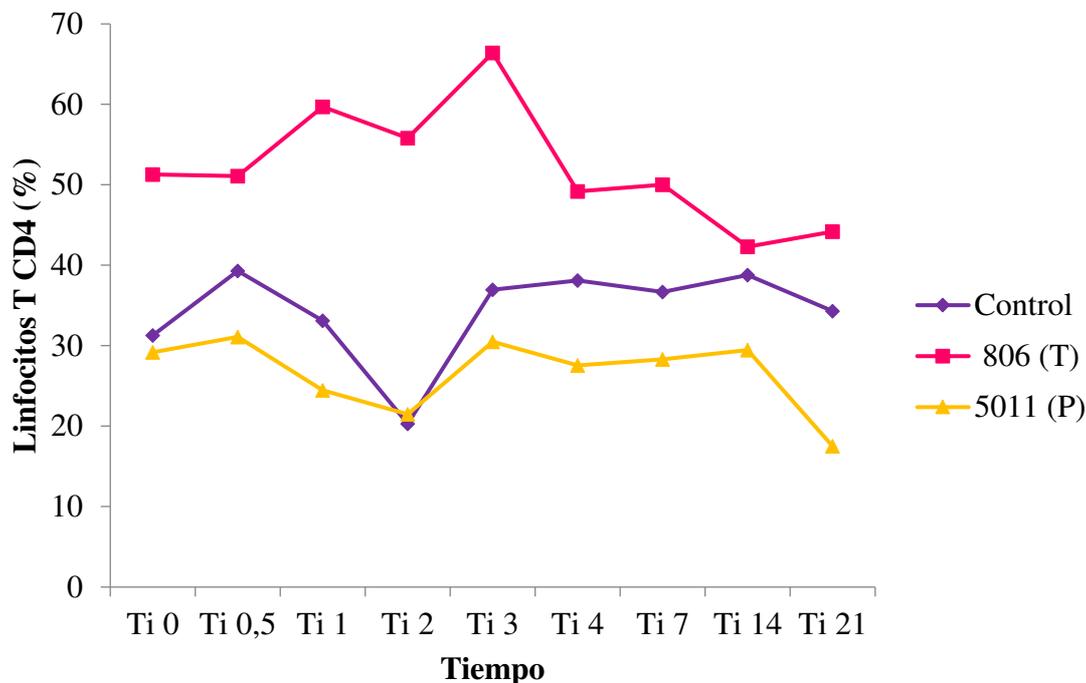
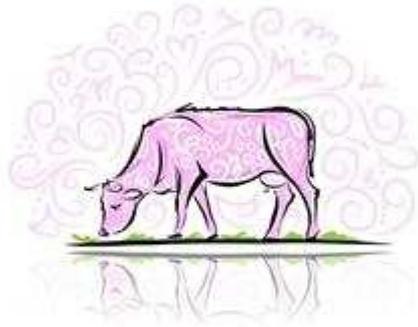


Figura 45. Porcentaje de linfocitos T CD4 en sangre periférica de animales desafiados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* y controles inoculados con solución fisiológica a diferentes tiempos post-inoculación. Ti0: tiempo 0 pre-inoculación; Ti0,5: 12 hs post-inoculación (post-i); Ti1: 24 hs post-i; Ti2: 48 hs post-i; Ti3: 72 hs post-i; Ti4: 96 hs post-i; Ti7: 7 días post-i; Ti14: 14 días post-i; Ti21: 21 días post-i. (T): Cepa aislada de una IIM transitoria. (P): Cepa aislada de una IIM persistente. Control: Animales inoculados con solución fisiológica.

5 Discusión



✧ Caracterización molecular genotípica y fenotípica.**5.1.1. Evaluación de la presencia de genes de virulencia.**

Se ha documentado que la mayoría de las infecciones causadas por *S. aureus* se deben a sus múltiples FV, los cuales actúan de manera coordinada para promover la infección, lo que dificulta el estudio del rol preciso que cumple cada factor en la patogenia de las IIM (Zecconi y Scali, 2013). Por otra parte, se han descripto correlaciones entre cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina y la expresión de determinados FV, lo cual permite inferir sobre el modo en que estos factores contribuyen al desarrollo de la infección (Melchior y col., 2011, Szweda y col., 2012; Bardiau y col., 2014). En este sentido, utilizando técnicas de tipificación molecular descriptivas, se han observado asociaciones entre determinados tipos genéticos y características clínicas y epidemiológicas, determinándose que las cepas de *S. aureus* que causan infecciones P difieren de las que causan infecciones T (Haveri y col., 2007; 2008; Graber y col., 2009; Ote y col., 2011). En base a estos antecedentes se ha postulado que el progreso de la IIM hacia la resolución o hacia la cronicidad podría estar relacionado con las características de la cepa y con la expresión de combinaciones específicas de FV.

En este estudio con la finalidad de seleccionar 2 cepas de *S. aureus* con características genéticas diferenciales que puedan asociarse con la capacidad de adaptación a la GM bovina, se evaluó la presencia de genes de virulencia relacionados con la expresión de polisacáridos capsulares (*cap5* y *cap8*), producción de *biofilm* (*agr*, *ica* y *bap*) y resistencia a los antibióticos β -lactámicos (*blaZ*). El conocimiento de estos FV es de importancia fundamental para comprender los mecanismos de adaptación de *S. aureus* al microambiente de la GM bovina. Cabe destacar que la selección de las cepas utilizadas en este estudio se realizó sobre la base de características clínicas y epidemiológicas, incluyendo aproximadamente el 10% de los aislados del cepario original. Si bien este no fue un muestreo aleatorizado, no se conocía a priori la distribución de los distintos FV entre las cepas seleccionadas.

Los serotipos de CP más prevalentes en el ganado bovino son los CP5 y CP8, mientras que los serotipos 1 y 2 son de hallazgo infrecuente. Se ha demostrado una gran variabilidad en la distribución de los serotipos capsulares entre los aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina de diferentes países del mundo (Poutrel y col., 1988; Guidry y col., 1998; Han y col., 2000; Tollersrud y col., 2000; Salimena y col., 2016) y de

Argentina, donde la información es más limitada (Sordelli y col. 2000; Buzzola y col., 2007; Camussone y col., 2012; Ambroggio y col., 2018).

En esta tesis se evaluaron 34 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM T y P provenientes de las provincias Santa Fe (n = 27), Córdoba (n = 4), Buenos Aires (n = 2) y sin datos de origen (n = 1). Los resultados demostraron que la mayoría de las cepas evaluadas en esta tesis fueron portadoras de los genes *cap5* o *cap8* (94%), y la presentación de éstos fue en proporciones muy similares (45 y 50 %, respectivamente) y solo un pequeño porcentaje de las cepas fueron clasificadas como NT (6 %). En un estudio realizado por Camussone y col. (2012) en 157 aislados de *S. aureus* procedentes de mastitis clínicas y subclínicas registradas en las provincias de Santa Fe (n = 91), Buenos Aires (n = 31), Córdoba (n = 22) y Entre Ríos (n = 13); se presentaron menores porcentajes de prevalencia para los genes *cap*, donde un 64 % de las cepas fue positiva para *cap5* o *cap8*, y de ellas el 53 % fue *cap5* y el 11 % fue *cap8*. Se observó, además, que la presencia de los *loci* capsulares varió según la distribución geográfica. En un estudio anterior realizado por Reinoso y col. (2008) con 15 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en distintos rodeos lecheros de la provincia de Buenos Aires, se demostró que 7 cepas fueron caracterizadas genotípicamente como tipo *cap5*, mientras que ninguna como tipo *cap8*.

En un estudio reciente, Ambroggio y col. (2018) evaluaron fenotípica y genéticamente el perfil capsular de 144 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en Argentina, Chile y Uruguay. Estos autores, en concordancia a los resultados obtenidos en esta tesis, observaron que el 96 % de los aislamientos de *S. aureus* tenían genes *cap5* y *cap8*. De las 55 cepas de *S. aureus* procedente de Chile, el 67,3% eran portadoras de genes *cap5* y 32,7 % de *cap8*. De las 38 cepas de Uruguay, el 44,7% portaban genes *cap5* y el 55,3 % genes *cap8*. De las 51 cepas de Argentina, 88,2 % portaba genes *cap8* y el 11,8 % restante fueron NT. Cabe aclarar que en el mencionado estudio, los 51 aislados procedentes de Argentina fueron definidos como NT en un estudio previo (Camussone y col., 2012).

En otras partes del mundo, los aislamientos de *S. aureus* de rumiantes han mostrado cierta variabilidad respecto de la distribución de los genes *cap*. Salimena y col. (2016) evaluaron la presencia de genes *cap* a partir de 159 aislados de *S. aureus* procedentes de diferentes regiones de Brasil y observaron que 100 % de las cepas eran portadoras de genes *cap*, de las cuales el 80 % portaban genes *cap5* y el 20 % restante *cap8*. Otros estudios realizados en diferentes países informaron que *cap5* y *cap8* se distribuyeron uniformemente entre aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina (Bar-Gal y col., 2015)

o que hubo una mayor proporción de *cap8* que de *cap5* (Salasia y col., 2004; Babra y col. 2013; Marques y col., 2013; Bardiau y col., 2014). La caracterización genotípica es altamente significativa debido a que varios factores involucrados en la expresión de cápsula no han sido del todo definidos, y su expresión *in vivo* no se correlaciona necesariamente con la expresión *in vitro* (O’Riordan y Lee, 2004). En el mencionado estudio de Camussone y col. (2012), al evaluar fenotípicamente la presencia de CP, se observó que el 50 % de los aislamientos con genotipo *cap5* o *cap8* fueron capaces de producirlo *in vitro*. Asimismo, en el estudio de Ambroggio y col. (2018), si bien el 96 % de los aislamientos de *S. aureus* eran portadores de genes *cap*, más del 75% de las cepas evaluadas no expresaron cápsula. La falta de expresión de CP podría deberse a la falta de locus *cap5 (8)* o a mutaciones puntuales dentro de los genes esenciales que codifican la cápsula, mutaciones en las regiones promotoras de *cap5 (8)*, o supresión del locus *cap5 (8)* (Cocchiaro y col. 2006). Además, se han identificado cepas que presentan mutaciones en genes que regulan la expresión de la cápsula, como *agr* o *arlRS* (Cocchiaro y col., 2006). En esta tesis si bien se halló una alta prevalencia de bacterias portadoras de genes *cap*, no se evaluó la expresión de cápsula *in vitro*.

En función de la información existente podemos concluir que la prevalencia de cepas capsuladas y de los genotipos *cap5* y *cap8* es variable entre aislamientos de *S. aureus* de mastitis bovina y está marcadamente influenciada por la región geográfica de la cepa. La alta prevalencia de los genes *cap* observada en esta tesis coincide parcialmente con los descrito por otros autores, sin embargo, la mayor parte de los aislados evaluados provienen de la provincia de Santa Fe, por lo cual para determinar la prevalencia real de estos genes en cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas a nivel país se requieren más estudios con un mayor número de cepas de diferentes procedencias seleccionadas aleatoriamente, lo cual escapa a los objetivos de esta tesis.

La cronicidad de las IIM por *S. aureus* se ha atribuido en parte a la capacidad de esta bacteria para producir *biofilm* (Gomes y col., 2016). Si bien la habilidad de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina para producir *biofilm in vitro* ha sido reportada en numerosos estudios (Oliveira y col., 2006; Dhanawade y col., 2010), la demostración de su formación *in vivo* continúa siendo un desafío (Veh y col., 2015; Schönborn y Krömker, 2016).

En el presente estudio, se observó que la mayoría de los aislados de *S. aureus* fueron portadores de los genes *icaA* (97 %), *icaC* (97 %) e *icaD* (100 %), mientras que ninguno de ellos presentó el gen *bap*. En Argentina, la información disponible sobre la prevalencia

de genes *ica* en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina es escasa. En un estudio reciente Felipe y col. (2017) evaluaron la presencia de los genes *icaA*, *icaD* y *bap* sobre un total de 127 cepas de *S. aureus* provenientes de IIM subclínicas de diferentes tambos comerciales de las provincias de Córdoba y Buenos Aires, observando un 100 % de prevalencia para los genes *icaA* e *icaD* y un 11 % de prevalencia para *bap*. Asimismo, Marques y col. (2013), en un estudio realizado a partir de 20 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM subclínicas en el estado de Río de Janeiro, Brasil, detectaron una prevalencia del 85 % para *icaA*, 95 % para *icaD* y un 5 % para *bap*. En forma similar a lo observado en esta tesis, Soares y col. (2017), evaluaron 128 cepas de *S. aureus* provenientes de IIM subclínicas de diferentes regiones de Brasil y determinaron que el 67 % de las cepas eran portadoras del gen *icaA* y el 87 % del gen *icaD*. Por otra parte, Salimena y col. (2016) en el mismo estudio antes descrito en 159 cepas de *S. aureus*, determinaron que todos los aislamientos albergaron los genes *icaA* y *icaD*, y el 95.6 % de los aislamientos portaban el gen *bap*, además el 97,5 % eran productores de *biofilm*. Khoramian y col. (2015) en un estudio realizado en Irán, a partir de 215 cepas de *S. aureus* provenientes de infecciones en humanos y de vacas lecheras con mastitis subclínicas, demostraron una prevalencia del 87 % para *icaA*, del 88 % para *icaD* y no detectaron el gen *bap*. En EE.UU. Vasudevan y col. (2003), a partir de 35 aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina, determinaron que el 100 % de las cepas eran portadoras de los genes para producción de *biofilm*, *icaA* e *icaD*, pero solo el 68,6 % de las cepas mostraron capacidad para producir *biofilm in vitro*.

Aunque el 100 % de las cepas analizadas en esta tesis fueron negativas para el gen *bap*, todas ellas mostraron diferente capacidad para producir *biofilm in vitro*. Esto concuerda con otros estudios donde se sugiere que los genes *ica* y *bap* representan caminos sintéticos alternativos para la producción de *biofilm* (Tormo y col., 2005; Notcovich y col., 2018). En estudios previos, el gen *bap* se ha encontrado en islas de patogenicidad que son capaces de transmitirse horizontalmente entre cepas y no están presentes en todas las cepas (Ubeda y col., 2003; Tormo y col., 2005). La pérdida de estas islas por transferencia horizontal de genes podría ser una posible explicación respecto al gran número de aislados negativos (Notcovich y col., 2018).

Respecto a la producción de *biofilm in vitro* de las cepas evaluadas en este estudio, se observó que el 100 % de las mismas fueron productoras de *biofilm* en alguna medida: el 32,5 % lo hizo en forma débil, el 32,5 % en forma moderada y el 35 % fue fuerte productora de *biofilm*. En forma similar a lo observado en este trabajo, Felipe y col.

(2017) evaluaron la producción de *biofilm in vitro* a partir de 127 cepas de *S. aureus* y observaron que un 20 % (26/127) se comportaron como débiles productoras, un 45 % (57/127) como moderadas y un 35 % (44/127) como fuertes productoras de *biofilm*. Por otra parte, Khoramian y col. (2015), observaron que el 70 % (155/215) de los aislamientos analizados en su estudio, mostraron capacidad de producir *biofilm in vitro*. Entre éstos, 59 % fueron débiles productores de *biofilm*, mientras que 34 % y 5 % produjeron *biofilm* en forma moderada y fuerte, respectivamente.

Si bien la portación de *ica* no es predictiva de la intensidad de producción de *biofilm* (Atkin y col., 2014), la presencia de al menos uno de los genes *ica* en la mayoría de los aislamientos indica que PIA es un mediador importante en la formación de los *biofilm* producidos por *S. aureus* y demuestra la importancia potencial del locus *ica* en la patogénesis de la mastitis bovina.

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la mayoría de las cepas estudiadas fueron identificadas como agr-tipo I (94 %), y solo un pequeño número agr-tipo II (6%). En concordancia con estos hallazgos, Buzzola y col. (2006), reportaron una alta prevalencia (88 %) de cepas agr-tipo I en aislados de *S. aureus* procedentes de diferentes provincias de Argentina. En un estudio reciente, Ambroggio y col. (2018), evaluaron los tipos agr de 144 cepas de *S. aureus* procedentes de Argentina, Chile y Uruguay. En concordancia con lo hallado en esta tesis, observaron que la mayoría de las cepas estudiadas pertenecían al agr-tipo I (76 %). De las cepas restantes, el 9 % fueron identificadas como agr-tipo III, el 6 % como como agr-tipo II, el 1 % como agr-tipo IV y un 8% fueron no tipificables. Asimismo, Gilot y col. (2002), demostraron una alta prevalencia de cepas agr-tipo I (69 %) en aislados de diferentes regiones del mundo. Sin embargo, la información disponible sobre la distribución de los tipos agr en distintas partes del mundo no es homogénea. En un estudio reciente a partir de cepas aisladas de diferentes regiones de Brasil, Soares y col. (2017), determinaron una prevalencia del 81 % de cepas agr-tipo II y un 18 % no pudo clasificarse en ningún tipo agr. En los estudios de Melchior y col. (2009) el 81 % de las cepas de campo recogidas en los Países Bajos pertenecían al agr-tipo II, mientras que el 9% pertenecía al agr-tipo I.

Ambroggio y col. (2018) observaron una alta correlación entre la falta de expresión de cápsula y el agr-tipo I de las cepas de *S. aureus* estudiadas. En esta tesis el 6 % de las cepas fueron clasificadas como NT y a su vez las mismas pertenecían al agr-tipo I. Por otra parte, Melchior y col. (2009), demostraron una alta correlación entre el agr-tipo I y II de los aislados de *S. aureus* y la cantidad de *biofilm* producida; una alta correlación

positiva entre cepas agr-tipo I y la presencia de genes de resistencia a β -lactamasa (*blaZ*) y una alta correlación positiva entre cepas agr-tipo II y la presencia de IS257. Asimismo, Buzzola y col. (2007), observaron que cepas agr-tipo I mostraron una mayor habilidad para internalizarse en las MAC-T y mayor persistencia en tejido mamario murino, en comparación con cepas agr-tipo II, III y IV. En el presente estudio las cepas de *S. aureus* que se identificaron como agr-tipo I (94 %) provenían en su mayoría (73 %) de IIM T; aunque el bajo número de aislados no permitió establecer correlaciones. Por otra parte, todas las cepas identificadas como agr-tipo I (94 %) mostraron capacidad para producir *biofilm in vitro* en diferentes intensidades (leves, moderadas y fuertes) y un bajo porcentaje (22 %) fueron positivas para el gen *blaZ*. Las cepas agr-tipo II (6 %) mostraron fuerte capacidad para producir *biofilm* y no fue posible identificar el gen *blaZ* en ninguna de ellas. Como se contó con un limitado número de cepas agr-tipo II, los resultados de esta tesis no permitieron realizar asociaciones entre el tipo agr, la capacidad para producir *biofilm* y la presencia del gen *blaZ*.

Haveri y col. (2007) demostraron una asociación significativa entre la presencia del gen *blaZ* en cepas de *S. aureus* y la persistencia de la IIM en bovinos. En esta tesis no se pudo establecerse tal asociación por el limitado número de aislados, ya que de las 34 cepas de *S. aureus* evaluadas sólo 7 fueron portadoras del gen *blaZ* (21 %) y de éstas 5 (71 %) provenían de IIM T y sólo 2 (29 %) de IIM P. Los porcentajes hallados en esta tesis sobre presencia del gen *blaZ* en los aislados de *S. aureus* analizados fueron inferiores a los hallados por Srednik y col. (2018) en un estudio reciente, donde sobre un total de 80 cepas de *S. aureus* procedentes de tambos distribuidos principalmente en la provincia de Buenos Aires, detectaron una prevalencia del 40 %.

En un trabajo reciente publicado por Srednik y col. (2018), en Argentina, se evaluaron 229 aislados de *S. aureus* de mastitis clínicas y subclínicas, no detectándose ninguna cepa positiva a *mecA*. Los resultados obtenidos en esta tesis a partir del análisis de las 6 cepas seleccionadas para el estudio por genotipificación de ADN coinciden con los observados por estos autores, ya que no se detectaron cepas portadoras del gen *mecA*. Sin embargo, en otros países se han detectado cepas de *S. aureus* provenientes de IIM bovinas portadoras de este gen. En un estudio realizado en India a partir de 52 cepas aisladas de mastitis clínicas y subclínicas se determinó una prevalencia para *mecA* del 9% (Kutar y col., 2015), otro trabajo a partir de 105 aislados de *S. aureus* en Nigeria, mostró una prevalencia del 7% (Suleiman y col., 2012), en Bélgica a partir de 118 muestras de leches mastíticas se determinó una prevalencia del 9% (Vanderhaeghen y col., 2010), y

en Italia, a partir de 160 cepas de *S. aureus* de analizadas, se determinó una prevalencia del 3% (Normanno y col., 2007).

5.1.1 Evaluación de la diversidad genética por PFGE y genotipificación de ADN.

En un estudio reciente, Srednik y col. (2018) evaluaron mediante PFGE la diversidad genética de 80 cepas de *S. aureus* procedentes de diferentes provincias de Argentina. Estos autores observaron una amplia variabilidad genética entre los aislados, los cuales se agruparon en 23 pulsotipos (PT) diferentes; de los cuales 7 (A, B, N, P, S, T, U y V) representaron el 68,7% de los aislamientos y 12 PT (A, B, F, G, J, K, M, N, P, S, T y U) ocurrieron en más de un establecimiento. En esta tesis, se determinaron los perfiles genéticos mediante PFGE de 34 aislamientos identificados como *S. aureus* por pruebas fenotípicas y genotípicas. El PFGE reveló una alta tasa de diversidad genética dentro de los aislamientos evaluados, discriminando 27 PT diferentes. Estos hallazgos se relacionan con resultados obtenidos por otros autores en otras partes del mundo, donde informan alta variabilidad genética entre cepas de *S. aureus* procedentes de IIM bovinas (Capurro y col., 2010; Lundberg y col., 2014). Capurro y col. (2010) sobre un total de 82 aislados de *S. aureus* procedentes de casos de mastitis clínica de diferentes regiones de Suecia, obtuvieron 25 PT, donde el PT más común fue encontrado en el 26 % de los aislamientos y distribuido en todas las regiones evaluadas. Lundberg y col. (2014) sobre un total de 185 aislamientos de *S. aureus* provenientes IIM clínicas en Suecia, obtuvieron 29 PT, donde 2 PT fueron clasificados como comunes y encontrados en el 64 % de los casos de IIM clínicas. En el presente trabajo, la mayoría de los aislamientos estuvieron representados por 1 PT exclusivo y el más común fue el PT P que agrupó el 17,64 % de las cepas analizadas. De las 6 cepas incluidas en el PT P, 4 fueron aisladas de diferentes tambos de la provincia de Córdoba y las 2 restantes de diferentes tambos de la provincia de Santa Fe, lo que indicó una amplia distribución de este PT. Todas las cepas agrupadas en el PT P provenían de IIM T. El PT U incluyó 2 cepas clonalmente idénticas, una de la provincia de Santa Fe y otra de Buenos Aires, ambas procedentes de IIM T. El resto de las cepas se distribuyeron en PT individuales.

Haveri y col. (2007) a partir de 161 cepas de *S. aureus*, evaluaron la relación entre el perfil genético de los aislados, la persistencia de la infección y la resistencia antimicrobiana. Estos autores observaron que las cepas que portaban genes que codifican PTSAg (superantígeno de toxina pirogénica) fueron más comunes entre los PT

predominantes y causantes de IIM persistentes. Además, las cepas que concomitantemente portaban los genes *sed*, *sej* y *blaZ*, codificados por plásmidos, se encontraban típicamente asociadas a IIM persistentes. En este estudio, debido al limitado número de cepas evaluadas, no fue posible establecer asociaciones entre la procedencia de la cepa (IIM T o P), la agrupación en PT y la resistencia antimicrobiana.

Basado en publicaciones previas, los CC más comunes en mastitis bovina en diferentes países se asocian con ST97, ST126, ST133, ST151, ST479 y ST771 (Smith y col., 2005; Aires-de-Sousa y col., 2007; Rabello y col., 2007; Sung y col., 2008; Smyth y col., 2009; Hata y col., 2010; van den Borne y col., 2010; Jagielski y col., 2011; Sakwinska y col., 2011).

En un estudio reciente Srednik y col. (2018) evaluaron la diversidad genética mediante PFGE y MLST de cepas de *S. aureus* procedentes de diferentes provincias de Argentina. Estos autores observaron que las cepas agrupadas en los PT U y N pertenecían al ST97 y representaron el 31,2 % del total de los aislamientos, siendo este ST el más dominante. El PT P (ST746) y el PT S (ST746) fueron encontrados en más de un establecimiento. Los ST97, ST746 y ST2187 conformaron el 48,7 % de los aislados tipificados y estos ST fueron parte del CC97, un linaje ampliamente distribuido en casos de mastitis bovina en todo el mundo (Smith y col., 2005; Monecke y col., 2007) y ocasionalmente en humanos (Luedicke y col., 2010; Wang y col., 2015). Este último dato coincide con los resultados obtenidos en esta tesis, donde el CC dominante fue CC97, identificado en el 50 % de las cepas (179, 037 y 5128) de *S. aureus* pre-seleccionadas. Estos datos concuerdan con trabajos previos en los cuales se ha sugerido que pocos clones, con amplia distribución geográfica, serían los responsables de la mayoría de los casos de mastitis (Smith y col., 2005).

En un estudio reciente Artursson y col. (2016) evaluaron la diversidad genética de 70 cepas de *S. aureus* aislados de mastitis clínica aguda en Suecia mediante PFGE y MLST. De las 70 cepas analizadas, 53 se agruparon en 3 PT predominantes denominados (E, Q y U). Diez de los 11 aislados asignados como PT E pertenecían a CC97, 13 de los 16 aislados asignados como PT Q pertenecían a CC133 y 25 de los 26 aislados asignados como PT U pertenecían a CC705 (= CC151). En el presente trabajo, similar a lo observado por los mencionados autores, 3 de las 6 cepas evaluadas pertenecían al CC97 y 1 cepa (3) al CC133. Este último linaje ha sido descrito en cabras y ovejas (Rabello y col., 2007; Smyth y col., 2009) y más raramente en aislados de mastitis bovina (Artursson y col., 2016). Por otra parte, en el presente estudio, la cepa 5011 se agrupó en el CC188, que

parte de un linaje principalmente humano, susceptible a la meticilina y ocasionalmente aislada del ganado (Monecke y col., 2011). La cepa 806 se identificó como ST350; este linaje podría ser propio de nuestra región geográfica ya que hasta la fecha este ST no ha sido descrito en bovinos de otros lugares del mundo.

En el presente estudio, PFGE mostró mayor poder discriminatorio que la genotipificación de ADN ya que, mediante PFGE las 6 cepas pre-seleccionadas se agruparon en diferentes PT; mientras que, mediante la genotipificación de ADN de las 6 cepas analizadas, 3 de ellas (179, 037 y 5128) se agruparon dentro del mismo CC (CC97). Esto coincide con los resultados obtenidos por Srednik y col. (2018) quienes observaron que, aunque los PT con similitudes del 80% y superiores pertenecían al mismo ST, también el mismo ST fue compartido entre otros PT diferentes. Como ejemplo los autores citan que: los PT asignados con letras U y N pertenecían al ST97, los PT P y T pertenecían al ST746 y los PT A y B pertenecían al ST705.

5.1.2 Curvas de crecimiento.

Los resultados demostraron que el crecimiento *in vitro* de las bacterias analizadas fue similar a lo largo del tiempo y la cepa V329 de *S. aureus* fue la que presentó la fase de crecimiento logarítmico más prolongada y la que mostró menor velocidad de crecimiento difiriendo en forma significativa con las demás cepas estudiadas. Esta cepa, se incluyó como control debido a la fuerte capacidad que posee para formar *biofilm* y por ser portadora del gen *bap* (Cucarella y col., 2001). Los resultados obtenidos con la cepa V329 podrían indicar una mayor tasa de replicación bacteriana en el proceso de infección temprana, lo cual podría asociarse a una mayor capacidad por parte de la bacteria para persistir en el ambiente extracelular (Valle y col., 2012).

En un trabajo previo Pereyra y col. (2016) observaron que cepas de *S. aureus* aisladas de IIM persistentes mostraron una velocidad de multiplicación *in vitro* más lenta en comparación con cepas aisladas de IIM no persistentes; sin embargo, estas diferencias en las tasas de crecimiento no se relacionaron con la capacidad invasiva de las cepas a las células MAC-T. En esta tesis, los aislados procedentes de IIM T y P mostraron fases de crecimiento logarítmico y velocidades de crecimiento similares, difiriendo con los resultados observados por Pereyra y col. (2016), lo cual podría estar relacionado con las características particulares de las cepas utilizadas en cada estudio.

✧ Evaluación de la adherencia e internalización de cepas de *S. aureus* en MAC-T.

Los resultados de los ensayos de internalización mostraron que las UFC/ml recuperadas del interior de las MAC-T fueron similares para ambos períodos de crecimiento bacteriano (fase de crecimiento logarítmica y estacionaria), sin embargo, los resultados fueron más reproducibles (inter-ensayo) con las cepas en fase de crecimiento logarítmico. En contraste con estos resultados, Lammers y col. (1999), observaron que tanto en ensayos de adherencia como de invasión el número de UFC/ml recuperadas fue significativamente mayor cuando se enfrentaron MAC-T con cepas de *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmico en comparación con cepas en fase de crecimiento estacionaria. Los autores, a partir de los resultados obtenidos, interpretaron que los FV de *S. aureus* que están implicados en la adherencia e invasión a las células de la GM bovina se expresan principalmente en la fase exponencial de crecimiento. En esta tesis, los ensayos de internalización en diferentes fases de crecimiento, se realizaron utilizando únicamente 2 cepas de *S. aureus*, lo cual determina que no puedan hacerse comparaciones directas con los resultados observados por Lammers y col. (1999).

Estudios previos demostraron que la habilidad de *S. aureus* para adherirse y/o internalizarse en células epiteliales mamarias bovinas no difiere entre linajes adaptados al bovino; aunque sí se han observado diferencias significativas entre aislados individuales (Hensen y col., 2000; Budd y col., 2016). En este sentido, Pereyra y col. (2016), utilizando cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas persistentes y no persistentes con diferentes perfiles genéticos y portadoras de genes para la adherencia y producción de *biofilm*, demostraron que la capacidad de internalización de *S. aureus* en células MAC-T varió con cada cepa en particular y que todas ellas sobre expresaban genes de adherencia y formación de *biofilm* en comparación con las cepas que no internalizaban. Los ensayos de internalización en esta tesis se realizaron con 7 cepas de *S. aureus* con distintos perfiles genéticos y con diferente capacidad de adaptación a la GM bovina. Dentro de estos aislados se incluyó la cepa V329, fuerte productora de *biofilm*, para evaluar la capacidad de internalización de una cepa *bap* positiva. En concordancia con lo observado en los estudios de Pereyra y col. (2016), todas las cepas de este estudio presentaron diferentes capacidades para internalizar células epiteliales mamarias bovinas. Particularmente, la cepa 806 (T) mostró una capacidad de internalización significativamente menor a las demás cepas; mientras que la cepa 3 (T) fue la que mayor capacidad de internalización presentó mostrando diferencias significativas con la cepa

806 (T). Las demás cepas mostraron capacidades de internalización intermedias pudiéndose recuperar de las MAC-T similares números de UFC/ml.

En este estudio, la cepa 806 (T), caracterizada como agr-tipo II, portadora del gen *cap8* y fuerte productora de *biofilm*, mostró una baja capacidad para adherirse e internalizarse en las MAC-T en comparación con las demás cepas estudiadas. La baja capacidad de adherencia observada en la cepa 806 (T) podría explicar, en parte, la baja capacidad de internalización a la MAC-T.

Bardiau y col. (2014), en un estudio que incluyó 229 aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina, observaron que las cepas *cap8*/CP8 y agr-tipo II mostraron una baja tasa de internalización en comparación con las cepas NT y agr-tipo I. A partir de estos resultados, los autores sugirieron que los aislados caracterizados como agr-tipo II, que expresaban el antígeno capsular CP8 y que mostraban baja supervivencia intracelular, estarían probablemente mejor adaptados a un nicho extracelular. Asimismo, Buzzola y col. (2007), observaron que aislados de *S. aureus* agr-tipo II, III, y IV se internalizaron de manera menos eficiente a las MAC-T, sugiriendo que estos aislados pueden ser más susceptibles de ser atacados por la respuesta inmune del hospedador porque tenderían a permanecer en grandes cantidades en el ambiente extracelular. Los resultados de Bardiau y col. (2014) y Buzzola y col. (2007) concuerdan con los obtenidos en esta tesis para la cepa 806 (T), la que además de ser portadora del gen *cap8* e identificada como agr-tipoII, ha demostrado baja capacidad de adherencia e internalización a la MAC-T, sugiriendo una mejor adaptación al nicho extracelular y menor probabilidad de vida intracelular. Es importante considerar, que en esta tesis sólo se evaluó la presencia o ausencia de los genes *cap5* y *cap8* y no se determinó la expresión de los polisacáridos capsulares (CP5 o CP8). Los resultados de los ensayos de adherencia/internalización y las características particulares de la cepa 806 (T), llevaron a la selección de la misma como candidata para la realización de los ensayos *in vitro* con macrófagos e *in vivo* en bovinos.

En los estudios de Buzzola y col. (2007) las cepas que pertenecían al agr-tipo I e identificadas como NT mostraron mayor capacidad de internalización a las MAC-T que las cepas pertenecientes a otros tipos agr. Resultados similares fueron descritos en los trabajos de Bardiau y col. (2014, 2016) los cuales sugirieron que las cepas agr-tipo I y NT pueden estar mejor adaptadas al nicho intracelular y conducir a IIM crónicas. En esta tesis, en los ensayos de internalización se incluyó la cepa 179 (T) que fue clasificada como NT, identificada como agr-tipo I y con capacidad moderada para producir *biofilm*

in vitro. La misma mostró una capacidad de internalización intermedia y similar a la de las cepas 37, 5011, 5128 y V329. La cepa V329 mostró capacidad invasiva similar a la descrita por Valle y col. (2012). Por otra parte, la cepa 5011 (P) portadora del gen *cap5*, caracterizada como agr-tipo I y débil productora de *biofilm*, mostró una capacidad intermedia de adherencia e internalización a las MAC-T en comparación con las demás cepas evaluadas. Considerando las características genéticas y el origen de la cepa 5011 (procedente de una IIM P) estos resultados podrían sugerir una mejor adaptación al nicho intracelular y supervivencia en el ambiente de la GM bovina. Estas características particulares, llevaron a la selección de la cepa 5011 (P) como candidata para la realización de los ensayos *in vitro* con macrófagos e *in vivo* en bovinos.

✂ Evaluación de la capacidad de cepas de *S. aureus* de persistencia y de inducción de muerte en células MAC-T.

La capacidad de *S. aureus* para sobrevivir intracelularmente podría explicar varios aspectos de las relaciones entre el hospedador y el patógeno en lo que respecta a las enfermedades recurrentes estafilocócicas crónicas y a la colonización a largo plazo. La internalización puede ser un componente importante de la mastitis y otras enfermedades estafilocócicas, proporcionando protección contra las defensas del hospedador y el tratamiento con antibióticos (Bayles y col., 1998). En el presente trabajo se evaluó la capacidad de persistencia de las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P) en células MAC-T hasta las 96 hs pi. Cabe aclarar que son escasos los estudios disponibles sobre persistencia intracelular en cultivos primarios o líneas celulares epiteliales mamarias bovinas de cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina (Bouchard y col., 2013). Además, en los estudios disponibles se ha prestado especial interés en la exploración de la capacidad de persistencia de fenotipos bacterianos conocidos como variantes pequeñas o *small colony variants* (SCVs) de *S. aureus* (Atalla y col., 2010; Zhu y col., 2016) o en otros, los ensayos de persistencia han sido menos prolongados en el tiempo (Martínez-Pulgarín y col., 2009).

Atalla y col. (2008) en trabajos previos reportaron el aislamiento de variantes pequeñas de *S. aureus* o SCVs, generadas naturalmente a partir de bovinos con historia de IIM crónica por *S. aureus*, sugiriendo una posible asociación entre mastitis bovina persistente y formación de SCVs. En un estudio posterior, Atalla y col. (2010) evaluaron la persistencia intracelular en células MAC-T de una cepa de *S. aureus* aislada de mastitis

crónica con fenotipo SCV, denominada Heba3231, de la cepa salvaje o parental 3231 y de la cepa Newbould 305. Estos autores observaron que la recuperación de SCV a partir del lisado de MAC-T fue significativamente mayor a la detectada con las cepas 3231 y Newbould 305 a las 3,8 hs pi. Además, en incubaciones adicionales detectaron SCV viables recuperadas de las MAC-T hasta las 96 hs pi, mientras que con la cepa 3231 a las 24 hs pi ya no fue posible aislar bacterias. En esta tesis, utilizando ensayos similares a los empleados por Atalla y col. (2010), observamos que las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P) presentaron diferente capacidad para persistir en las células MAC-T a lo largo del tiempo. En concordancia con lo observado por los mencionados autores, la cepa 5011 aislada de una IIM P, logró mejor adaptación al nicho intracelular y pudo recuperarse hasta las 72 hs pi; mientras que la cepa 806, aislada de una IIM T, sólo pudo recuperarse hasta las 4 hs pi. Estos datos se relacionan, además, con la baja capacidad de adherencia/internalización detectada para la cepa 806 (T) en comparación con la alta capacidad de adherencia/internalización detectada para la cepa 5011 (P).

En este estudio, la cepa 5011 (P) pudo recuperarse a partir del lisado de células MAC-T desde las 4 hs hasta las 72 hs pi, observándose una disminución gradual en la cantidad de bacterias recuperadas a lo largo del tiempo. Estos resultados coincidieron con los de Martínez-Pulgarín y col. (2009), quienes informaron que después de un corto período de replicación intracelular (2 hs), el número de *S. aureus* internalizadas en las células MAC-T disminuyó gradualmente con el tiempo.

Por otra parte, en el presente estudio, se evaluó la presencia de bacterias viables en las MAC-T infectadas con las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados observados coincidieron parcialmente con los hallados en los ensayos de persistencia antes descriptos. En las células MAC-T infectadas con la cepa 806 (T) se evidenció la presencia de bacterias viables intracitoplasmáticas desde las 4 hasta las 48 hs pi, mostrando una densidad decreciente con el progreso del tiempo; mientras que, en los ensayos de persistencia la bacteria solo pudo recuperarse hasta las 4 hs pi. Esto podría explicarse argumentando que el número de bacterias viables intracitoplasmáticas luego de las 4 hs pi fue muy bajo e insuficiente para lograr reproducirse en el medio de cultivo. Por otra parte, y en coincidencia con lo observado en los ensayos de persistencia, en las células MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P) de *S. aureus* se evidenció la presencia de bacterias viables intracitoplasmáticas desde las 4 hasta las 72 hs pi, mostrando una densidad mayor a la observada con la cepa 806 (T), la cual fue decreciendo con el progreso del tiempo.

A partir de los resultados descriptos, se pudo observar que las cepas 806 (T) y 5011 (P) de *S. aureus* mostraron diferentes capacidades para adaptarse al ambiente intracitoplasmático de la MAC-T y persistir en el tiempo, demostrando la cepa 5011 (P) una mayor adaptación al nicho intracelular que la cepa 806 (T).

Estudios *in vitro* han demostrado que *S. aureus* se adhiere a las CEM y a componentes de la matriz extracelular y posteriormente las invade. *Staphylococcus aureus* puede escapar del interior del endosoma al citoplasma de la CEM e inducir la apoptosis (Bayles y col., 1998). Durante las IIM por *S. aureus*, la inducción de apoptosis por este patógeno puede generar daño en el tejido mamario, comprometer la respuesta inmune protectora y de este modo facilitar la propagación del microorganismo (Genestier y col., 2005; Zhao y Lacasse, 2008).

Hu y col. (2014) demostraron que *S. aureus* induce apoptosis en pBMEC a través del receptor de muerte Fas-FADD y que dicha inducción se asoció con la activación de caspasa-3 y caspasa-8, pero no de caspasa-9. En concordancia con lo observado por Hu y col. (2014), en este estudio se demostró que en todos los tiempos evaluados (4, 24, 48 y 72 hs pi), el principal mecanismo de muerte de las células infectadas con ambas cepas de *S. aureus* fue la apoptosis, observándose los mayores porcentajes a las 24 hs pi. Por otra parte, se observaron diferencias en la inducción de apoptosis entre ambas cepas a lo largo del tiempo, detectándose para la cepa 5011 (P) mayores porcentajes de apoptosis en relación a la cepa 806 (T) y al tiempo basal a las 4, 24 y 48 hs pi. Si bien las diferentes características experimentales no permiten hacer comparaciones directas, este aumento en la inducción de apoptosis por parte de la cepa 5011 (aislada de una IIM P) podría relacionarse con resultados previos obtenidos por Andreotti y col. (2017) en tejido mamario bovino durante la involución mamaria, en el cual se observó un incremento en los porcentajes de apoptosis de las células epiteliales mamarias en los tejidos provenientes de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* en relación a los porcentajes obtenidos en tejidos no infectados. La mayor capacidad para inducir apoptosis de las células epiteliales infectadas demostrada para la cepa 5011 (P), en comparación con la de la cepa 806 (P), podría relacionarse con una mayor inducción de daño al tejido mamario y mayor diseminación y persistencia de la bacteria en la GM.

✂ Evaluación de la viabilidad de células MAC-T luego del co-cultivo con cepas de *S. aureus*.

Los resultados mostraron que a las 4 hs pi la viabilidad de las MAC-T infectadas con las cepas 806 (T) y 5011 (P) no se vio afectada, mostrando valores de DO similares a los de las células no infectadas. Sin embargo, a las 24 hs pi, la viabilidad de las células infectadas con la cepa 5011 (P) fue significativamente menor a la detectada en las células infectadas con la cepa 806 (T) y a la de las células no infectadas. Estos resultados coinciden con los observados en los ensayos sobre inducción de muerte celular, donde a las 24 hs pi se observó el mayor porcentaje de apoptosis en las MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P). La colonización intracelular podría ser uno de los factores que conduce a una disminución en la viabilidad de las MAC-T infectadas con la cepa 5011 (P), ya que, según lo descrito anteriormente, esta cepa demostró alta capacidad de adherencia, internalización y mayor persistencia en las MAC-T en comparación con la cepa 806 (T). Por otro lado, a las 48 y 72 hs pi la viabilidad de las células MAC-T infectadas fue similar para ambas cepas y menor a la observada en las células no infectadas, esto último podría deberse al daño celular inducido por la infección con ambas cepas de *S. aureus*.

Como especie, *S. aureus* comprende un grupo heterogéneo de cepas, cada una con el potencial de elaborar su propio conjunto de FV (Bayles y col., 1998). Las cepas seleccionadas para los ensayos de esta tesis presentan diferentes combinaciones de FV que pueden ser los responsables de las diferencias en los resultados *in vitro*. Además, como estos ensayos se han realizado con placas de MAC-T en confluencia es necesario considerar que si bien numerosas células se han observado dañadas mediante microscopía de contraste de fase, otras del mismo pocillo mantienen su integridad, por lo cual seguirán metabolizando activamente el colorante, ello podría explicar la conversión del XTT en los pocillos infectados a las 48 y 72 hs pi. Además, las bacterias también son capaces de metabolizar el colorante (Higa y col., 1998) por lo que los datos obtenidos en estos ensayos deben interpretarse cuidadosamente y en asociación a los hallazgos de los otros ensayos *in vitro*.

✧ Ensayos de fagocitosis, persistencia y respuesta inflamatoria de macrófagos infectados con *S. aureus*.

En este trabajo, la elección de los macrófagos para la realización de los ensayos de fagocitosis, se basó en que estas células constituyen el tipo predominante en leche de vacas sanas y secreción de secado, y son las primeras células del sistema inmune que interaccionan con las bacterias invasoras (Rainard y Riollot, 2006); además expresan

receptores para IgG₁ e IgG₂, son fagocitos activos y están involucrados en la presentación de antígenos en asociación con moléculas clase I y II del CMH (Sordillo y Streicher, 2002; Rainard y Riollet, 2006).

Los macrófagos durante la mastitis son indispensables para el reconocimiento y eliminación de las bacterias que ingresan a la GM (Aitken y col., 2011). En esta tesis el porcentaje de macrófagos con bacterias asociadas (intracelulares o adheridas a su superficie) fue significativamente mayor en los fagocitos enfrentados a la cepa 5011 (P) en comparación con los enfrentados a la cepa 806 (T). Un resultado similar también se observó para el IFM (cantidad de bacterias promedio asociada por macrófago), siendo significativamente mayor en los fagocitos enfrentados a la cepa 5011 (P) en relación a la cepa 806 (T). Estos resultados sugieren que la cepa 5011 (P) fue reconocida y fagocitada con mayor eficiencia que la cepa 806 (T), lo cual podría relacionarse con las características propias de la cepa y la expresión de determinados FV. Es importante destacar que no se han reportado trabajos en los cuales se compare la capacidad fagocítica de macrófagos enfrentados a cepas de *S. aureus* con características genéticas diferenciales y con diferente capacidad de adaptación a la GM.

La capacidad de los macrófagos para matar patógenos depende, en parte, de mecanismos dependientes de oxígeno y nitrógeno (ROS / RNS, respectivamente) (Foster, 2005). Los mecanismos bactericidas dependientes de oxígeno incluyen la producción de ROS, como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo (Cabiscol y col., 2000). Los oxidantes reactivos desempeñan un papel crítico en la defensa del hospedador y en otros procesos fisiológicos y también participan en la regulación de la apoptosis y la homeostasis inmunológica (Serhan y Savill, 2005; Quinn y col., 2006). En esta tesis, no se observaron diferencias en los porcentajes de producción de ROS (células HE positivas) por parte de los macrófagos enfrentados con ambas cepas de *S. aureus*, ni tampoco en la cantidad de ROS promedio producida por célula (evaluado por el parámetro de IFM). Sin embargo, sí se evidenció un incremento significativo en los porcentajes de producción de ROS intracelular por parte de los macrófagos FITC+ infectados con la cepa 5011 (P) en comparación con los infectados con la cepa 806 (T); aunque la cantidad producida (estimada por el IFM de los macrófagos FITC+ que produjeron ROS), fue similar para ambas cepas evaluadas. Estos resultados indican que la cepa 5011 (P) de *S. aureus* indujo la activación de un mayor número de macrófagos capaces de producir ROS en relación a la cepa 806 (T); sin embargo, la cantidad de ROS producida por célula fue similar para ambas cepas de *S. aureus*.

La habilidad de los macrófagos para eliminar patógenos se ha relacionado con la capacidad de estas células para generar ON, un compuesto altamente bactericida (Jungi y col., 1999). El ON se genera a partir del metabolismo de la L-arginina y su producción está regulada por el efecto de citoquinas como el IFN- γ . En el presente trabajo, cuando los macrófagos fueron enfrentados con ambas cepas de *S. aureus*, la producción de nitritos (formados por la oxidación espontánea del ON) fue similar a la observada en los macrófagos no infectados (producción basal). Es importante aclarar que no se han reportado estudios que evalúen la producción de ON por parte de macrófagos aislados de secreción mamaria que hayan sido enfrentados a diferentes cepas de *S. aureus* que puedan aportar datos para la discusión de los resultados obtenidos en esta tesis. Jungi y col. (1999), en un trabajo previo, evaluaron la capacidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas (inactivadas por calor) para promover la inducción de la síntesis de ON por macrófagos derivados de monocitos bovinos. Estos autores observaron que las bacterias Gram positivas como estímulos únicos, fueron 4 veces menos potentes para inducir la síntesis de ON que los organismos Gram negativos. En el mencionado estudio dentro de los organismos Gram positivos evaluados se incluyó a *S. aureus* y se observó que este patógeno fue menos potente para estimular la producción de ON por parte de los macrófagos que *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*.

Por otra parte, trabajos previos han descripto que los macrófagos de leche son menos activos en la fagocitosis, que sus contrapartes de sangre (Mullan y col., 1985; Denis y col., 2006). Durante la involución activa la indiscriminada ingestión de los componentes de la leche por parte de los macrófagos torna a estas células menos efectivas para ejercer sus actividades bactericidas. En este estudio, los macrófagos que se utilizaron para los ensayos *in vitro* fueron aislados a partir de secreción mamaria obtenida a los 14 días post-secado. Si bien en el momento de la involución elegido para la toma de muestra los macrófagos constituyen el tipo celular predominante, es el periodo en el cual ocurre la máxima remodelación de la GM, lo cual podría incidir en la baja producción de ON observada en los macrófagos enfrentados a las cepas de *S. aureus*. Sin embargo, tal consideración debe ser tomada con cautela ya que, se conoce que los macrófagos expresan receptores para IgG₁ e IgG₂ (Desiderio y Campbell, 1980) y los obtenidos 10 a 15 días después del cese de la lactancia mostraron una mayor activación y captación de *S. aureus* cuando se incubaron con anticuerpos específicos (Renna y col., 2014).

En vacas crónicamente infectadas, se ha demostrado la presencia de *S. aureus* viables en el interior de macrófagos y en células alveolares aisladas de leche (Hebert y

col., 2000), lo cual favorecería la evasión de las defensas del hospedador por parte de la bacteria evitando ser reconocida por los receptores de la inmunidad innata con la consecuente persistencia en la GM. Por lo tanto, la infección subclínica repetida puede resultar de la existencia intracelular de la bacteria protegida de las defensas del hospedador así como del efecto de los antibióticos. A la fecha existe considerable incertidumbre sobre la eficiencia de los mecanismos microbicidas contra *S. aureus* por parte de los macrófagos así como sobre el destino final de los macrófagos que han ingerido *S. aureus*. Algunos informes sugieren que *S. aureus* induce la apoptosis de los macrófagos (Kubota, 2010; Wang y col., 2010), mientras que otros han descrito la persistencia intracelular de *S. aureus* en macrófagos resistentes a la apoptosis por factores microbianos (Kubica y col., 2008; Koziel y col., 2013). En esta tesis, mediante microscopia de fluorescencia se observaron bacterias vivas en el citoplasma de macrófagos desafiados con la cepa 5011 (P) a las 2 y 4 hs pi; mientras que en los macrófagos desafiados con la cepa 806 (T) sólo se observaron escasas bacterias vivas a las 2 hs pi. Estos resultados, en conjunto, indicarían que si bien la cepa 5011 (P) fue fagocitada en mayores porcentajes por parte de macrófagos que la cepa 806 (T); esa misma cepa mostró una mayor capacidad de resistencia a los mecanismos microbicidas desencadenados por los macrófagos en comparación con la cepa 806 (T). Los resultados obtenidos en esta tesis podrían relacionarse con el estudio de Jubrail y col. (2016), en el cual utilizando una línea celular de macrófagos humanos, demostraron que aunque los mecanismos microbicidas intracelulares matan rápidamente a *S. aureus* luego de la ingestión, éstos se agotan progresivamente. La maduración fagolisosómica y la acidificación son incompletas y los macrófagos por tanto, mantienen una población de bacterias intracelulares, que pueden persistir durante períodos prolongados escapando de otros potenciales mecanismos para la eliminación bacteriana.

Si bien en el presente estudio mediante microscopia de fluorescencia se observaron bacterias vivas en el citoplasma de macrófagos desafiados con la cepa 806 (T) y 5011 (P) hasta las 2 y 4 hs pi, respectivamente; no fue posible el cultivo de las bacterias a partir del lisado de los macrófagos enfrentados con las dos cepas de *S. aureus* en ninguno de los tiempos evaluados (2, 4, 8 y 24 hs pi). Esto podría explicarse argumentando que el número de bacterias viables intracitoplasmáticas luego de las 2 y 4 hs pi para ambas cepas fue muy bajo e insuficiente para lograr reproducirse en el medio de cultivo. La ausencia de bacterias vivas intracitoplasmáticas después de las 4 hs pi; así como la falta de aislamiento de ambas cepas de *S. aureus* partir de los lisados celulares

infectados, demuestra que los macrófagos aislados de secreción mamaria de secado son capaces de fagocitar y desplegar mecanismos bactericidas para *S. aureus*. Además, considerando que en este estudio la producción de ON de los macrófagos infectados fue similar a la de los no infectados, se podría inferir que luego de las fagocitosis, el principal mecanismo microbida empleado por los macrófagos para eliminar ambas cepas de *S. aureus* fue el dependiente de oxígeno.

Los objetivos específicos 2.2.3. y 2.2.4. se discutirán juntos en el siguiente apartado, ya que el primero representa la puesta a punto del segundo.

✂ Puesta a punto de la infección experimental en la glándula mamaria bovina.

Los modelos de IIM experimentales en bovinos han servido de manera confiable para inducir los signos característicos y específicos de mastitis por *E. coli* y *S. aureus* en varios estudios realizados en las últimas décadas (Schukken y col., 1999; Shoshani y col., 2000; Bannerman y col., 2004). Aunque las condiciones de los animales y el diseño experimental varían entre los estudios, los desafíos experimentales con *E. coli* generalmente inducen mastitis clínicas mientras que los desafíos con *S. aureus* inducen mastitis clínicas leves o subclínicas (Bannerman y col., 2004; Vangroenweghe y col., 2004a; Whelehan y col., 2011; Pomeroy y col., 2016).

Existen en la bibliografía numerosos antecedentes sobre IIM experimentales en bovinos en las cuales se han empleado múltiples concentraciones bacterianas y diferentes cepas de *S. aureus*: ~40 UFC/ml (Bannerman y col., 2004; Lee y col., 2006); ~300 UFC/ml (Schukken y col., 1999); ~2000 UFC/ml (Shoshani y col., 2000); ~1x10³ UFC/ml (Atalla y col., 2009, Kim y col., 2011); 5x10⁶ UFC/cuarto (Lewandowska-Saba y col., 2013). La cepa Newbould de *S. aureus* se ha utilizado ampliamente en inoculaciones experimentales debido a su alta capacidad de adaptación a la GM bovina (Smith y col., 2005; Bouchard y col., 2012; Boerhout y col., 2016). Esto demuestra que los modelos experimentales de infección *in vivo* han sido extensamente probados y constituyen una herramienta efectiva para la investigación sobre la respuesta inmune del hospedador frente a diferentes patógenos causantes de mastitis bovina (Petzl y col., 2018).

Para la inoculación intramamaria de ambas cepas de *S. aureus* se utilizó una suspensión bacteriana conteniendo ~250 UFC en 1 ml. La selección de la concentración bacteriana a inocular se basó en estudios previos donde, utilizando inóculos con baja

carga de la cepa Newbould 305 de *S. aureus* (~72 UFC en 2 ml) lograron establecer IIM clínicas leves en todos los cuartos inoculados (Bannerman y col., 2004).

En este estudio se logró inducir de manera exitosa la IIM en los cuartos inoculados con ambas cepas de *S. aureus*. La cepa 806 (T) causó una IIM clínica leve en el cuarto inoculado, demostrado por la presencia de grumos en la leche a las 48 y 72 hs post-i. Además, se observó un aumento en el RCS que alcanzó un pico a las 48 hs pi y fue posible el aislamiento de *S. aureus* a partir de leche a las 48 y 72 hs post-i. Por otra parte, la cepa 5011 (P) causó una IIM subclínica en el cuarto inoculado, sin cambios macroscópicos en la leche y microbiología negativa en todos los tiempos de muestreo; sin embargo, se observó un incremento en el RCS que fue menor y más gradual que el inducido por la cepa 806 (T), alcanzando los mayores recuentos a las 96 hs post-i. Los cuartos mamarios controles inoculados con solución fisiológica, no presentaron signos clínicos de inflamación, no mostraron variaciones en los RCS en leche y la microbiología fue negativa en todos los tiempos evaluados.

Considerando que con la concentración bacteriana utilizada en este estudio se logró inducir una IIM clínica leve en el cuarto inoculado con la cepa 806 (T) y una IIM subclínica en el cuarto inoculado con la cepa 5011 (P), se decidió realizar el desafío experimental en un mayor número de animales.

✧ Infección experimental con cepas T y P de *S. aureus*: respuesta inmune innata y adaptativa.

Es importante aclarar que en esta tesis el reducido número de animales empleados para la IIM experimental con las cepas 806 (T) y 5011 (P) no permitió el tratamiento estadístico de los datos, por lo tanto, los resultados presentados son preliminares y descriptivos. Tomando tal consideración la discusión de los resultados se realizó con la debida mesura a los fines de no dar lugar a especulaciones.

5.1.3 Monitoreo de la IIM.

En esta tesis a partir de la inoculación intramamaria experimental se observó que ambos cuartos del animal desafiado con la cepa 806 (T) desarrollaron mastitis clínica aguda. La misma se clasificó como leve en el cuarto AD y moderada en el cuarto PI (Jubb

y col., 2016; Zachary, 2016). Los signos clínicos observados en el cuarto AD fueron grumos en la leche desde las 24 hs hasta los 7 días post-i, sin otros cambios visibles en el tejido mamario y coincidente con altos RCS y aislamiento microbiológico de *S. aureus* desde las 24 hs hasta las 72 hs post-i. Debido a la severa respuesta inflamatoria y al desarrollo de una IIM combinada con 2 patógenos, el cuarto PI fue tratado con un antibiótico por vía intramamaria y debió ser excluido del ensayo.

Los 2 animales que fueron desafiados con la cepa 5011 (P) en los cuartos (AD) y (PI) no mostraron signos de mastitis clínica. Sin embargo, en tres cuartos mamaros de diferentes animales, se logró el desarrollo de una IIM subclínica. Los 3 cuartos infectados no mostraron signos evidentes de inflamación, excepto el cuarto PI de un animal, en el cual se evidenciaron pequeños grumos en la leche antes del ordeño de la mañana, sólo a los 14 días post-i.

La respuesta diferencial observada en este estudio en las formas de presentación de la IIM entre ambas cepas, ha sido descrita por otros autores en estudios experimentales de infección. En los mismos, se ha observado que la inoculación de bacterias en la GM conduce a una dinámica de diseminación del microorganismo altamente variable entre vacas e incluso entre cuartos de la misma vaca, indicando la variación en la susceptibilidad dependiente de la vaca o del cuarto (Schukken y col., 1999; Tollersrud y col., 2006). Asimismo, se conoce que la respuesta inmune del animal y por lo tanto la susceptibilidad a las IIM pueden variar de acuerdo con la etapa de la lactancia (Schukken y col., 2009). En esta tesis, todas las vacas utilizadas para las inoculaciones experimentales estaban en el último tercio de la lactancia. Por otra parte, otros estudios han sugerido que la gravedad de las mastitis en vacas, es el resultado de las diferencias en el repertorio de FV que expresan las cepas, la respuesta inmune del hospedador o la interacción patógeno-hospedador (Schalm y col., 1971; Bar-Gal y col., 2015).

Pereyra y col. (2017) utilizando dos cepas de *S. aureus* diferenciadas según criterios fenotípicos, genéticos y clínicos (una procedente de IIM subclínica persistente-P y otra IIM clínica no persistente-NP) evaluaron la capacidad de persistencia en la GM y la reacción inflamatoria inducida luego de la IIM experimental en ratones. En forma similar a lo observado en esta tesis, las dos cepas de *S. aureus* utilizadas en el modelo de ratón, reflejaron el comportamiento clínico observado en el bovino. En general, la cepa de *S. aureus* procedente de IIM NP fue capaz de desencadenar un proceso inflamatorio agudo que logró controlar la infección y se vió reflejado en una disminución en el número de bacterias recuperadas de la GM a los 11 ds post-i. En cambio, la cepa procedente de IIM

P indujo un proceso inflamatorio crónico y si bien logró desencadenar una respuesta inflamatoria, la misma no fue suficiente para controlar el proceso infeccioso, demostrado por el alto número de UFC recuperadas de la GM hasta el día 11 post-i.

5.1.4 Recuentos de células somáticas y aislamiento microbiológico.

En los desafíos experimentales con *E. coli*, en general, los animales desarrollan los primeros signos de mastitis clínica dentro de las 12 hs post desafío, dependiendo del número inicial de patógenos inoculados y de su capacidad para dividirse y proliferar (Hill y col, 1979; Vangroenweghe y col., 2004b; Mitterhuemer y col., 2010); además, *E. coli* induce altos RCS en forma rápida ($> 500 \times 10^3$ cél/ml) dentro de las 24 hs, que pueden caer a los niveles pre-infección a las 48 hs. En cambio, el momento de aparición de signos detectables de mastitis después del desafío intramamario con *S. aureus* es variable. Las alteraciones se limitan principalmente a un aumento más gradual en el RCS a lo largo de un período de 48 a 72 hs después del desafío, con un aislamiento recurrente de *S. aureus* en la leche (Leitner y col., 2000; Bannerman y col., 2004; Petzl y col., 2008; Whelehan y col., 2011; Benjamin y col., 2015).

En esta tesis, los RCS difirieron entre las dos cepas de *S. aureus*, mostrando variaciones a lo largo del tiempo. En general, la respuesta inflamatoria inducida por la cepa 806 (T) fue mayor y más rápida que la de la cepa 5011 (P). En el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) se observó un pico en el RCS a las 48 hs pi; con un descenso marcado a partir del día 7 post-i, para alcanzar al día 21 valores similares a los del día 0 (pre-i). En cambio, en los cuartos mamarios inoculados con la cepa 5011 (P), no se observaron variaciones en los RCS hasta las 72 hs pi, indicando una menor respuesta inflamatoria inicial en relación a la cepa 806 (T). A las 96 hs post-i se observó un incremento en el RCS, alcanzando al día 14 post-i el mayor valor, el cual fue inferior al máximo alcanzado por la cepa 806 (T). Para la cepa 5011 (P) los valores de los RCS continuaron elevados hasta el día 21 post-i.

En concordancia con lo observado en esta tesis, otros estudios han reportado altos RCS incluso cuando no fue posible el aislamiento de *S. aureus* a partir de la leche de la GM afectada (Miller y col., 1993; Rivas y col., 2000). Sin embargo, otros autores han observado que las vacas infectadas con *S. aureus* no necesariamente tienen elevados RCS, tal como lo pudimos observar durante las primeras 72 hs post-i en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P). Por lo tanto, en relación a lo observado por otros autores y a los

resultados obtenidos en esta tesis, el RCS de la leche estaría directamente influenciado por las características de la cepa de *S. aureus*.

El aislamiento de *S. aureus* a partir del cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) fue positivo a las 24, 48 y 72 hs post-i y el número de UFC/ml recuperado fue disminuyendo con el progreso del tiempo (5000, 1500 y 500 UFC/ml, respectivamente). A las 96 hs y a los 7 días post-i, el cultivo fue negativo, mientras que a los 14 y a los 21 días post-i se volvió a aislar el microorganismo recuperándose un bajo número de UFC/ml (100 UFC/ml y 300 UFC/ml, respectivamente). A partir del día 21 y hasta el día 56 post-i, mediante cultivos microbiológicos, se realizó el seguimiento de la IIM con la cepa 806 (T) y ya no fue posible el aislamiento de *S. aureus*, indicando la cura bacteriológica. Por otra parte, en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P), fue posible el aislamiento de *S. aureus* al día 7, 14 y 21 post-i, recuperándose en general un bajo número de colonias en cada tiempo de muestreo (300 UFC/ml en promedio). Además, en el cuarto PI (animal 2) fue posible aislar la bacteria hasta los 42 ds post-i, en el cuarto AD (animal 3) hasta los 49 ds post-i y en el cuarto PI (animal 3) hasta los 56 ds post-i; confirmando la capacidad de la bacteria para adaptarse al microambiente de la GM y desarrollar una IIM crónica o persistente. El hecho de que *S. aureus* no haya podido aislarse en todos los periodos de muestreo luego del desafío con ambas cepas refleja el patrón cíclico de eliminación de *S. aureus* en la leche que ha sido descrito por otros autores (Daley y col., 1991; Bannerman y col., 2004).

Las diferencias observadas en este estudio sobre la persistencia de las cepas de *S. aureus* en la GM, podrían estar relacionadas con la portación y expresión de determinados FV tal como lo demuestran Buzzola y col. (2007) en IIM experimentales en GM murina desafiadas con cepas de *S. aureus* de diferente tipo agr. Estos autores, en coincidencia con lo observado en esta tesis, demostraron que las cepas de *S. aureus* agr-tipo II o IV fueron más eficientemente eliminadas de la GM que las del tipo I, sugiriendo que las cepas agr-tipo I pueden persistir en mayor número en el tejido mamario que las cepas agr-tipo II, III y IV. En el presente estudio, la cepa 806 (T) clasificada como agr-tipo II fue eliminada de la GM con mayor eficiencia que la cepa 5011 (P) clasificada como agr-tipo I, la cual logró evadir al sistema inmune y persistir en la GM hasta los 56 ds post-i.

Por otra parte, y en concordancia con lo hallado en este estudio, Pereyra y col. (2017) investigaron la respuesta inmune inducida en ratones desafiados con dos cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina con diferente fenotipo, genotipo y adaptación a la GM (P y NP) y observaron que la cepa de *S. aureus* aislada de una IIM NP mostró una

capacidad de multiplicación mayor en el tejido en los estadios tempranos de la IIM en comparación con la cepa P, mientras que esta última si bien se multiplicó inicialmente a un ritmo menor, aumentó su capacidad de replicación desde las 120 hs post-i hasta el final del estudio (11 ds post-i), indicando mayor capacidad para evadir al sistema inmune del animal y persistir en la GM.

En relación a los resultados obtenidos hasta aquí, se puede resumir, que la cepa 806 (T), en relación a la cepa 5011 (P), fue capaz de inducir una respuesta inflamatoria mayor y más rápida para controlar la IIM, demostrado por los altos RCS registrados entre las 48 y 96 hs post-i y el aislamiento decreciente e intermitente de bacterias a partir de leche desde las 24 hs post-i hasta los 21 días post-i. Estos datos se relacionan, además, con la baja capacidad de adherencia, internalización y persistencia en MAC-T y menor viabilidad en macrófagos detectada para la cepa 806 (T). Estas características, en su conjunto, determinan una mayor adaptación de la cepa 806 (T) al nicho extracelular lo que conduciría a una detección temprana de la bacteria por parte del sistema inmune y al desarrollo de una respuesta inmune efectiva por parte del hospedador. Por otra parte, la cepa 5011 (P), en relación a la cepa 806 (T), fue capaz de inducir una respuesta inflamatoria más lenta y de menor intensidad, demostrado por los bajos RCS registrados hasta las 72 hs post-i. Además, en los ensayos *in vitro*, demostró alta capacidad de adherencia, internalización y persistencia en MAC-T y mayor viabilidad en macrófagos, lo que podría relacionarse con el aislamiento negativo de la bacteria en la leche hasta el día 7 post-i. Estas características sugieren una mejor adaptación de la cepa 5011 (P) al nicho intracelular con la subsiguiente modulación de los mecanismos de defensa del hospedador para lograr la persistencia en la GM.

5.1.5 Producción de ON.

Atakisi y col. (2010) observaron mayores concentraciones de ON en leche proveniente de GM con mastitis subclínica en relación a leche proveniente de GM no infectadas, indicando una relación entre la elevación de los niveles de ON y la inflamación. Se ha sugerido que las alteraciones en los niveles de ON en la leche podrían usarse como una herramienta de diagnóstico alternativa para detectar la inflamación durante la mastitis subclínica. En este sentido, Bouchard y col. (1999) y Atakisi y col. (2010) informaron una relación positiva entre los RCS y la concentración de ON en leche. En este estudio, en el cuarto inoculado con la cepa 806 (T) se observó un aumento en la

concentración de nitritos (formados por la espontánea oxidación del ON) desde las 12 hs post-i, alcanzando un máximo a las 48 hs post-i. Por otra parte, en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) se observó un incremento a partir del día 7 post-i, alcanzando la máxima concentración al día 21 post-i. En coincidencia con lo observado por Atakisi y col. (2010), los elevados niveles de ON detectados en leche con ambas cepas coincidieron con altos RCS en los mismos períodos.

En un trabajo reciente, Renna y col. (2019), evaluaron la concentración de ON en secreciones mamarias provenientes de vacas crónicamente infectadas con *S. aureus* y de vacas no infectadas durante la involución activa. Estos autores observaron que, la concentración de ON alcanzó sus niveles máximos al día 1 y 2 después de la interrupción de la lactancia con niveles similares entre infectados y no infectados; en consonancia con la respuesta inflamatoria que forma parte del proceso de involución de la GM (Silanikove y col., 2005). Sin embargo, a los 3 y 7 días de la involución, observaron una disminución significativa en las concentraciones de ON en las secreciones de cuartos infectados con respecto a no infectados, lo que los autores asociaron con una menor respuesta frente a la infección y con la capacidad de persistencia de *S. aureus* en la GM durante la involución activa. En el presente estudio, se evaluaron las concentraciones de ON en IIM experimentales durante la lactancia, lo que podría explicar las discrepancias observadas con el trabajo de Renna y col. (2019).

5.1.6 Cuantificación de los niveles de IL-1 β , IL-6 e IL-4 en muestras de leche.

En las IIM causadas por *S. aureus*, TNF- α , IL-1 β e IL-6 son las citoquinas pro-inflamatorias predominantes. Estas IL son mediadores claves de la respuesta inmune local y sistémica; no solo regulan la expresión de una amplia batería de genes incluyendo otras citoquinas, enzimas y proteínas de fase aguda, sino también de genes relacionados con la proliferación y la apoptosis (Pereyra y col., 2014). Se han detectado transcritos de ARNm de estas citoquinas en leche proveniente de vacas con IIM crónicas (Riollet y col., 2000; 2001) y con IIM agudas experimentales por *S. aureus*, aunque la transcripción fue marcadamente menor a la observada frente a infecciones experimentales por *E. coli* (Lee y col., 2006). Alluwaimi y col. (2003) observaron un incremento en la transcripción de TNF- α en células de leche en mastitis clínica causada por *S. aureus* a las 24 hs post-inoculación, con una fuerte disminución 8 hs más tarde. Esta disminución coincidió con un incremento en la producción de IL-1 β , la que se mantuvo elevada por 8 hs.

Comparada con otras citoquinas, la respuesta de IL-1 β frente a IIM experimentales ha mostrado ser altamente variable (Riollet y col., 2000; Banneman y col., 2004). En general en IIM experimentales por bacterias Gram positivas, se ha observado un retraso en la inducción de IL-1 β en comparación con la observada en la infección por bacterias Gram negativas (Kauf y col., 2007). Si bien la producción de ARNm de IL-1 β ha mostrado estar regulada positivamente en células de leche aisladas de GM infectadas con *S. aureus* (Riollet y col., 2001), se han observado resultados discordantes en cuanto a la detección de la proteína en leche. En este estudio, la respuesta de esta citoquina frente a la infección experimental con ambas cepas de *S. aureus* fue variable. En el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) se detectó un fuerte incremento en la concentración de IL-1 β en leche a las 48 hs post-i, mientras que en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) no se observaron variaciones significativas en la concentración de esta citoquina durante los tiempos evaluados, variando dentro del mismo rango que los controles. Los resultados observados para la cepa 5011 (P) coincidieron con los de Riollet y col. (2000) donde tras la inoculación experimental con una cepa de *S. aureus* aislada de un caso natural de mastitis bovina (cepa 107-59), no detectaron esta citoquina en leche en ninguno de los tiempos evaluados (desde el día 1 al día 28 post-i). En cambio, los resultados del desafío con la cepa 806 (T) coincidieron con los observados por Banneman y col. (2004) donde luego de una infección experimental con la cepa Newbould 305 observaron un aumento en las concentraciones de IL-1 β en leche luego de las 32 hs post-desafío y estas se mantuvieron por 8 hs adicionales. Estos resultados demuestran que las cepas utilizadas en este estudio son capaces de inducir diferentes respuestas inflamatorias a nivel local en la GM.

Durante la respuesta inflamatoria, IL-1 β regula la expresión de moléculas de adhesión en las células epiteliales y la quimiotaxis de neutrófilos en etapas tempranas de las infecciones causadas por *S. aureus* (Oviedo-Boyso y col., 2007). En esta tesis los elevados niveles de IL-1 β inducidos por la cepa 806 (T) a las 48 hs post-i coinciden con los niveles máximos de ON y con los mayores RCS detectados, demostrando la capacidad de esta cepa para inducir una respuesta inflamatoria local rápida por parte del hospedador lo que contribuyó a controlar la replicación del microorganismo. En cambio, la cepa 5011 (P), a diferencia de la 806 (T), indujo una menor reacción inflamatoria local durante las primeras 72 hs post-i, demostrada por los bajos niveles en leche de IL-1 β y ON, así como por los bajos RCS detectados. Por otra parte, los elevados niveles de ON y de células somáticas detectados al día 14 y 21 post-i en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P),

indican que esta cepa fue capaz de inducir una reacción inflamatoria más gradual y retardada que la cepa 806 (T) favoreciendo la adaptación del microorganismo al microambiente de la GM y su persistencia en el tejido. En este sentido, Renna y col. (2019) evaluaron los niveles de IL-1 β en secreciones mamarias provenientes de cuartos con infecciones crónicas por *S. aureus* y en cuartos sanos durante la involución activa de la GM y observaron que las concentraciones de IL-1 β fueron mayores en secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados con respecto a no infectados durante toda la involución, resaltando la importancia de esta citoquina en las infecciones crónicas por *S. aureus*.

La IL-6 es una citoquina que participa en la respuesta inflamatoria, la diferenciación, la activación de los linfocitos y la producción de inmunoglobulinas (Wong y Clark, 1988). Se han detectado concentraciones aumentadas de IL-6 en la leche y en la sangre de vacas con mastitis adquirida de forma natural (Hagiwara y col., 2001) e inducida experimentalmente (Shuster y col., 1997). En esta tesis se observó que el cuarto mamario infectado con la cepa 806 (T) mostró un marcado aumento en los niveles de IL-6 a las 48 hs post-i, en contraste con los cuartos mamarios infectados con la cepa 5011 (P) donde los niveles de IL-6 se mantuvieron en el mismo rango que en los controles. En un estudio realizado por Hagiwara y col. (2001), confirmaron elevados niveles de IL-6 en la primera etapa de la infección, con una concentración media de IL-6 en el primer día de la enfermedad 25 veces mayor en las muestras de leche y 5 veces mayor en las muestras de suero en vacas con mastitis aguda en comparación con vacas normales. Los autores de este trabajo sugirieron que los niveles de IL-6 en la leche y en suero dependen no solo de la fase de infección sino también del tipo de microorganismos que causan la mastitis.

La concentración de IL-6 tanto en leche como en suero fue significativamente mayor en mastitis causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, y *Streptococcus* sp.; pero significativamente más baja en mastitis causadas por SCN (Hagiwara y col., 2001). A su vez, Osman y col. (2010), quienes examinaron 25 vacas con mastitis subclínica y 15 vacas con mastitis clínica infectadas con SCN, informaron niveles significativamente más altos de IL-6 en la leche de las vacas con mastitis subclínica en comparación con las muestras de vacas con mastitis clínica y de vacas sanas. Por lo tanto, se podría considerar que la IL-6 es un indicador temprano, pero no específico de diversos estados inflamatorios y un marcador potencial de la forma subclínica de inflamación (Bochniarz y col., 2017).

Se ha documentado que las IIM por *S. aureus* inducen leucocitosis en la leche y los neutrófilos son el tipo celular predominante tanto en mastitis agudas como crónicas (Schalm y col., 1971; Wellnitz y Bruckmaier, 2012), jugando un rol clave en las defensas de la GM (Burvenich y col., 2007). En este sentido, las células presentes en la leche del cuarto infectado con la cepa 806 (T) a las 48 hs post-i, podrían ser las responsables del aumento en las concentraciones de IL-6 observadas en este mismo periodo.

Renna y col. (2019), en un estudio durante la involución activa, demostraron que las concentraciones de IL-6 en secreciones mamarias provenientes de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* fueron significativamente mayores a las detectadas en cuartos sanos, observándose un aumento con el progreso de la involución, alcanzándose los mayores niveles a los 14 días post secado. En esta tesis fue llamativa la falta de inducción de respuesta por parte de la cepa 5011 (P) en los niveles de IL-6, lo cual podría asociarse con las características propias de la cepa y su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador y adaptarse al microambiente de la GM.

La IL-4 es una citoquina pleiotrópica multifuncional producida principalmente por células T activadas, pero también por mastocitos, basófilos y eosinófilos. Funcionalmente, la IL-4 es mejor conocida por definir el fenotipo Th2 de los linfocitos y por regular la proliferación celular, apoptosis y expresión de numerosos genes en diversos tipos de células (Luzina y col., 2012). En un estudio realizado por Fonseca y col. (2009), la expresión relativa del gen que codifica para IL-4 en células de leche tendió a ser menor en vacas con mastitis clínica en comparación con animales sanos; sin embargo, esta diferencia no fue significativa. En otro estudio, Riollot y col. (2001) observaron que los transcritos de esta citoquina no fueron detectados en leche de cuartos mamarios crónicamente infectados con *S. aureus*. En esta tesis en los animales infectados con ambas cepas de *S. aureus*, los niveles de IL-4 fueron en general menores a los observados en leche de cuartos controles. Similar a lo observado en este estudio en IIM por *S. aureus*, Bochniarz y col. (2017) en 35 vacas Holstein-Friesian en lactación, determinaron que la concentración de IL-4 fue significativamente menor tanto en suero como en leche de vacas con mastitis causada por SCN en comparación con los animales controles.

Renna y col. (2019) observaron niveles de IL-4 significativamente superiores en secreciones mamarias de cuartos crónicamente infectados con *S. aureus* en comparación con cuartos controles a las 24 hs post secado, con una disminución hasta el día 14 y un retorno a niveles elevados al día 21 post secado. Las discrepancias observadas con el trabajo de Renna y col. (2019) podrían relacionarse con que la evaluación de IL-4 en esta

tesis se realizó en IIM experimentales durante la lactancia y en el mencionado estudio se realizaron en muestras de secreción mamaria provenientes de mastitis crónicas durante el periodo de involución activa. Se necesitan estudios adicionales con un mayor número de animales para poder caracterizar y comprender las funciones de la IL-4 en la respuesta inmune por *S. aureus*.

5.1.7 Evaluación de los niveles de IgG total en muestras de leche.

La IgG es el componente principal de la respuesta inmune de la GM responsable de promover la fagocitosis de los neutrófilos (Leitner y col., 2000). La subclase IgG₁ es el tipo de anticuerpo predominante en la leche de cuartos sanos debido a su transferencia selectiva a través de la barrera sangre-mamaria (Guidry y col., 1980). En la leche mastítica, IgG₂ se convierte en el anticuerpo dominante de la subclase de anticuerpos y se considera la opsonina principal que soporta la fagocitosis de neutrófilos en la GM bovina (Burton y Erskine, 2003).

Estudios previos demostraron que el aumento de IgG en la leche puede estar influenciado por el patógeno actuante, y que las bacterias Gram positivas que causan con frecuencia mastitis subclínica no interrumpen la barrera leche-sangre como lo hacen las bacterias Gram negativas lo cual influye en la transferencia de IgG a la leche (Hernández-Castellano y col., 2017).

En el presente estudio, en el cuarto mamario inoculado con la cepa 806 (T) se observó un pico en los niveles de IgG total en leche a los 7 ds post-i, que luego fue descendiendo para llegar al día 21 post-i a valores similares al tiempo 0 pre-i y a los valores obtenidos en cuartos controles; este resultado indicaría una respuesta inmune humoral específica frente a *S. aureus* durante las primera semana post-i que podrían haber contribuido a la opsonofagocitosis y a la eliminación de las bacterias por las células fagocíticas en este periodo. Por otra parte, en la leche de cuartos inoculados con la cepa 5011 (P), en general, no se observaron variaciones en los niveles de IgG total a lo largo del tiempo de muestreo, siendo estos superiores a los detectados en los cuartos controles. Además, al tiempo 0 (pre-i), los niveles de IgG total en los cuartos inoculados con la cepa 5011 (P) fueron superiores a los observados en cuartos controles. Estos resultados podrían sugerir una exposición previa del animal a la bacteria, en algún momento de su vida productiva. Resultados similares fueron observados por Renna y col. (2019) en un estudio donde se detectaron anticuerpos IgG, IgG₁ e IgG₂ específicos para *S. aureus* en

secreciones mamarias de cuartos no infectados durante el periodo de involución activa de la GM. Dado que las vacas utilizadas para esta tesis se seleccionaron en función de la ausencia de IIM en 3 muestreos microbiológicos y bajos RCS en 3 muestreos consecutivos pre-inoculación, los altos niveles de anticuerpos específicos en leche previos al desafío con la cepa 5011 (P) podrían ser el resultado de la exposición natural al patógeno antes del ensayo. Además, los niveles de anticuerpos podrían ser el resultado de la exposición natural a *S. aureus* en varios sitios del cuerpo, como la piel de la ubre y los orificios naturales (Rooijackers y col., 2005).

Los resultados obtenidos en esta tesis difieren de los observados por Renna y col. (2019) en secreciones mamarias provenientes de cuartos infectados crónicamente por *S. aureus* y controles no infectados durante la involución activa, donde observaron niveles inferiores de IgG e IgG₁ específicos en secreciones de cuartos infectados en comparación con no infectados, lo que los autores atribuyeron a la formación de complejos de bacterias-anticuerpos (Targowski y Niemialtowski, 1988). Las discrepancias observadas con el trabajo de Renna y col. (2019) podrían atribuirse a que las evaluaciones de los niveles de IgG en esta tesis se realizaron en IIM experimentales durante la lactancia.

En este trabajo la sensibilización de las placas de ELISA para evaluar los niveles de IgG total se realizó con lisado de las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P), observándose resultados similares en los niveles de IgG específicos para ambos antígenos en los diferentes tiempos de muestreo evaluados. Esto demuestra la inmunidad cruzada frente a los antígenos empleados, indicando que las inmunoglobulinas generadas contra una cepa de *S. aureus* podrían responder frente otras cepas heterólogas. Para confirmar estos hallazgos se deberían realizar ensayos de funcionalidad de los anticuerpos generados.

5.1.8 Evaluación de dinámica de las poblaciones de monocitos y de linfocitos T y B en sangre.

Los monocitos desempeñan un papel crucial en el control de la respuesta inmune inicial en infecciones bacterianas. En esta tesis los porcentajes de monocitos CD14 + en sangre periférica mostraron variaciones a lo largo del tiempo de muestreo para ambas cepas de *S. aureus*. En el animal desafiado con la cepa 806 (T) se observó una disminución importante en el porcentaje de monocitos CD 14 + en sangre periférica entre las 24 y 48 hs post-i; mientras que en los animales desafiados con la cepa 5011 (P) se observó un

aumento de estas células a las 48 hs post-i. Los monocitos y macrófagos son efectores críticos y reguladores de la inflamación que sirven como primera línea de defensa innata contra patógenos que invaden la GM. Durante la inflamación, los monocitos circulantes migran de la sangre a los tejidos en respuesta a la señalización de las quimiocinas, donde se diferencian en macrófagos (Rainard y Riollet, 2006). Por lo tanto el reclutamiento local y la acción de los macrófagos en la GM es un mecanismo de defensa inmunológico esencial contra la infección (Lewandowska-Sabat y col., 2013).

En esta tesis la disminución de los porcentajes de monocitos en sangre periférica en el animal desafiado con la cepa 806 (T) podría estar relacionado con una migración de estas células hacia la GM en respuesta a la infección. Respaldan esta hipótesis los altos RCS detectados desde las 48 hs y hasta las 96 hs post-i en el cuarto desafiado con la cepa 806 (T). Los altos porcentajes de monocitos observados en sangre a las 48 hs para la cepa 5011 (P), se relacionan con los bajos RCS observados en este periodo en la leche, confirmando la baja respuesta inflamatoria inducida por la cepa 5011 (P) durante las primeras 72 hs post-i. Si bien no se han reportado trabajos donde evalúen la dinámica de los monocitos-macrófagos en sangre y leche luego de una infección experimental con cepas de *S. aureus*, Bannerman y col. (2004) observaron un incremento en el RCS a partir de las 24 hs luego de la infección con *S. aureus* alcanzando un máximo a las 40 hs pi; sin embargo, la disminución significativa de los neutrófilos circulantes se produjo a partir de las 120 hs pi. Estos autores argumentaron que el retraso en el reclutamiento de neutrófilos a la GM después de la infección por *S. aureus*, induciría el reclutamiento de las células blancas de la médula ósea hacia la sangre durante un período más prolongado, lo cual impediría la disminución en los neutrófilos circulantes.

Los linfocitos $T\gamma\delta$ son significativamente más abundantes en los rumiantes, donde pueden llegar a constituir más del 70 % de los linfocitos circulantes de sangre periférica en animales jóvenes. La elevada frecuencia de estas células sugiere un rol importante en la respuesta inmune de los rumiantes (McGill y col., 2014). Las funciones de los linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos que han recibido mayor atención son la producción de quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias (Jutila y col., 2008, Hedges y col., 2016). Se ha demostrado que la respuesta de los linfocitos $T\gamma\delta$ bovinos a la estimulación con citoquinas o con antígenos bacterianos se caracteriza por la producción de IFN- γ (Price y Hope , 2009). Sin embargo, la contribución de estas células a la inmunidad de la GM y su importancia en la mastitis por *S. aureus* no está completamente establecida.

Paape y col. (2000) han postulado que los linfocitos $T\gamma\delta$ jugarían un rol importante en la respuesta inmune antibacteriana y que podría actuar como barrera funcional en el microambiente de las mucosas contra los patógenos bacterianos. La subpoblación de linfocitos $T\gamma\delta$ WC1+ representa un porcentaje bajo del total de linfocitos $T\gamma\delta$ en las secreciones normales de la GM (Riollet y col., 2001), pero aumenta notablemente luego del parto (Mallard y col., 1998). Es importante remarcar que en varios modelos murinos de infección por *S. aureus*, se ha demostrado que los linfocitos $T\gamma\delta$ son una fuente importante de IL-17, la cual participaría de la respuesta inmune protectora del hospedador (Cheng y col., 2012; Maher y col., 2013).

En esta tesis se pudo observar una marcada disminución de los linfocitos $T\gamma\delta$ en sangre periférica a las 48 hs post-i en el animal inoculado con la cepa 806 (T) y a los 14 días post-i en los animales inoculados con la cepa 5011 (P). La disminución de linfocitos en sangre coincide con los períodos de altos RCS en los cuartos infectados con ambas cepas y con el aislamiento de la bacteria, lo que llevaría a considerar que los linfocitos $T\gamma\delta$ podrían encontrarse actuando localmente a nivel de la GM.

Un mecanismo utilizado por el sistema inmune para aumentar la fagocitosis y la muerte de los microorganismos es la producción de anticuerpos específicos a niveles suficientes en el sitio de infección (Leitner y col., 2000). Como *S. aureus* puede invadir y sobrevivir intracelularmente, una estimulación preferencial de las células B, que sugiere el desarrollo de una respuesta humoral, puede no ser suficiente para eliminar las bacterias intracelulares, lo que podría explicar la persistencia de las IIM (Wellnitz y col., 2012).

Estudios previos han reportado aumentos en la proporción de linfocitos B en sangre periférica de bovinos desafiados experimentalmente con *S. aureus* en la fase crónica de la IIM (día 21 a 36 post-i) en comparación con la fase aguda (día 1 a 7 post-i) y la fase de pre-infección (Grönlund y col., 2006). En esta tesis los porcentajes de linfocitos B en sangre periférica en los animales inoculados con ambas cepas de *S. aureus* no mostraron mayores variaciones durante los diferentes tiempos evaluados y fueron menores a los porcentajes detectados en animales controles. Sólo al día 21 post-i se observó una caída marcada de estas células en sangre periférica en los animales inoculados con ambas cepas en comparación con los controles lo que podría relacionarse con un mayor reclutamiento de linfocitos B a la GM en las etapas avanzadas de la IIM.

En relación a la dinámica del aflujo de linfocitos B a la GM, no se han reportado trabajos que utilicen diseños de IIM experimental con diferentes cepas de *S. aureus* en bovinos; sin embargo, Pereyra y col. (201), en ratones desafiados con dos cepas de *S.*

aureus aisladas de mastitis bovina con diferente fenotipo, genotipo y adaptación a la GM (P y NP), demostraron que ambas cepas fueron capaces de estimular la migración de linfocitos B a la GM, y la cepa P indujo una respuesta inmune humoral más evidente y sostenida a lo largo del periodo de muestreo alcanzando los mayores porcentajes a los 11 ds post-i. En este estudio no fue posible evaluar los porcentajes de linfocitos B en leche y en tejido mamario, por lo tanto se torna difícil sustentar las diferencias observadas con otros trabajos.

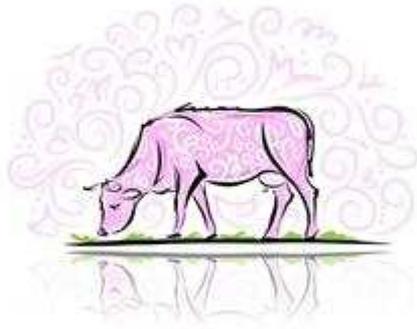
Durante las IIM causadas por *S. aureus* en GM bovina se han reportado incrementos tanto de linfocitos T CD4 como CD8 y un predominio de este último tipo de células cuando la infección se establece, sugiriendo un importante rol de los linfocitos CD8 en la mastitis crónica causada por *S. aureus* (Riollet y col., 2001; Rivas y col., 2002; Grönlund y col., 2006).

En el presente estudio, el porcentaje de linfocitos TCD4 en el animal infectado con la cepa 806 (T) fue mayor que el observado en los animales infectados con la cepa 5011 (P) y controles en todos los periodos evaluados; observándose a las 72 hs post-i el mayor porcentaje en sangre periférica. En los animales infectados con la cepa 5011 (P) el porcentaje de linfocitos TCD4 en sangre periférica fue inferior al de los controles en todos los periodos evaluados. Por otra parte, los linfocitos T CD8 mostraron una disminución marcada en sangre a las 48 y 96 hs post-i en el animal inoculado con la cepa 806 (T). Mientras que, en los animales inoculados con la cepa 5011 (P), el porcentaje de linfocitos T CD8 fue inferior al observado en los controles y no mostró variaciones llamativas durante los diferentes tiempos evaluados. Los datos mencionados coinciden parcialmente con los de Nagahata y col. (2011) quienes observaron que los porcentajes de linfocitos CD4 y CD8 en sangre periférica de vacas con infecciones crónicas naturales por *S. aureus* fueron similares a los detectados en vacas sanas. Por otra parte, observaron que los porcentajes de linfocitos CD8 en leche de vacas con mastitis crónica por *S. aureus* aumentaron en forma significativa en comparación con los linfocitos de la sangre periférica. Este hallazgo coincide con lo observados anteriormente por Shoshani y col., (2000) y Rioillet y col., (2001).

En estudios previos la disminución en el recuento de linfocitos en sangre de vacas infectadas con *S. aureus* se asoció con un aumento en el recuento de linfocitos en la leche (Ostensson 1993; Rivas y col., 2000), indicando una migración desde la sangre hacia la GM. En este estudio, la falta de cuantificación de linfocitos en leche así como el bajo número de animales infectos, no permite analizar tales asociaciones.

Los resultados que se han discutido hasta aquí sobre IIM experimentales con diferentes cepas de *S. aureus* en bovinos, son preliminares. Por lo tanto, para no caer en especulaciones y poder discutir en profundidad las variaciones en los niveles de citoquinas e inmunoglobulinas en leche así como la dinámica de las diferentes poblaciones inmunes en sangre periférica de animales infectados con las cepas 806 (T) y 5011 (P) se necesitan realizar nuevos desafíos experimentales con un mayor número de animales.

6 Conclusiones



Los resultados obtenidos y su discusión con los aportes de otros autores, permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

El comportamiento *in vitro* de las dos cepas (T y P) de *S. aureus* seleccionadas fue diferente:

- La cepa 806 (T), seleccionada por su baja adaptación a la GM bovina, portadora de los genes *cap8*, *agrII*, *icaACD* y fuerte productora de *biofilm in vitro*, mostró una baja capacidad de adherencia, internalización y persistencia intracelular en las MAC-T. Este comportamiento demuestra una mejor adaptación al ambiente extracelular.

- La cepa 5011 (P), seleccionada por su alta adaptación a la GM bovina, *cap5*, *agrI*, *icaACD*, *blaZ* y débil productora de *biofilm*, mostró alta capacidad de adherencia, internalización y persistencia en MAC-T. Además, en comparación con la cepa 806 (T), indujo mayores porcentajes de muerte por apoptosis. Este comportamiento demuestra una mejor adaptación al ambiente intracelular.

- Los macrófagos infectados con la cepa 5011 (P), en comparación con la 806 (T) mostraron una mayor capacidad fagocítica y mayor capacidad para producir ROS, sugiriendo que esta cepa fue reconocida y fagocitada con mayor eficiencia que la 806 (T).

- En los macrófagos desafiados con la cepa 5011 (P) fue posible la identificación de bacterias vivas en el citoplasma de los fagocitos en tiempos más prolongados que en los desafiados con la cepa 806 (T); indicando una mayor capacidad de resistencia a los mecanismos microbicidas por parte de la cepa 5011 (P).

- No fue posible el cultivo de las bacterias a partir del lisado de los macrófagos enfrentados con las cepas 806 (T) y 5011 (P), indicando un limitado número de bacterias viables intracelulares.

Considerando los resultados preliminares obtenidos a partir de la IIM experimental en bovinos, las cepas (T y P) de *S. aureus* fueron capaces de inducir una respuesta inflamatoria diferencial para el control de la infección.

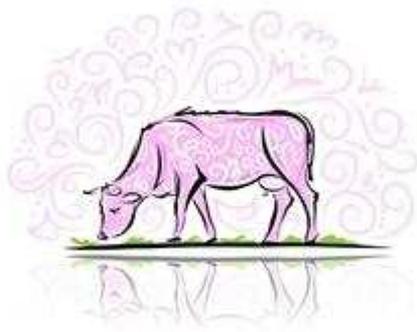
- La cepa 806 (T) fue capaz de inducir una mastitis clínica leve, desencadenando una inflamación rápida y efectiva para controlar la infección, lográndose la cura bacteriológica (IIM T). Además, esta cepa en sangre provocó una marcada modificación en las principales poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa. Estos datos sugieren que la cepa 806 (T), mejor adaptada al nicho extracelular de la GM, fue reconocida por las células de la inmunidad innata y logró inducir una respuesta efectiva por parte del hospedador para su control.

- La cepa 5011 (P) fue capaz de inducir una IIM subclínica crónica o P, desencadenando respuesta inflamatoria de menor intensidad y más tardía que la cepa 806 (T) demostrado por los bajos RCS hasta las 72 hs post-i, los bajos niveles de citoquinas detectados en leche y el aislamiento intermitente del microorganismo. Además, en sangre, no indujo modificaciones relevantes en las poblaciones de células inmunes. Estos datos sugieren que la cepa 5011 (P) desarrolló estrategias para adaptarse y sobrevivir en el ambiente de la GM, desplegando mecanismos eficientes para evadir la respuesta inmune del hospedador.

En conjunto, todos estos hallazgos sugieren que el comportamiento *in vitro* de una cepa, en relación a su capacidad de invasión y persistencia en diferentes tipos celulares, podría ser de gran ayuda para predecir su comportamiento en una infección natural de la GM bovina. Además, que el comportamiento clínico observado *in vivo* podría estar determinado por una combinación de FV de la bacteria que al actuar de manera coordinada favorecerían el desarrollo de una IIM T o P. Para ampliar el entendimiento sobre la respuesta inmune del hospedador frente a diferentes cepas *S. aureus* serán necesarios futuros estudios con un mayor número de animales.

Por otra parte, el conocimiento del perfil molecular de las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina en un rodeo, podría convertirse en una herramienta que permita exponer los patrones de genes de virulencia más prevalentes y avanzar en la elucidación de la patogenia de esta enfermedad. Esto será fundamental para el desarrollo de estrategias superadoras destinadas a la prevención y el control de las IIM causadas por este patógeno.

7 Bibliografía



- Aarestrup FM, Jensen NE. 1998. Development of Penicillin Resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. *Microb Drug Resist.* 4: 247-256.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, Baker DL, Baker A. 2012. *Immunología celular y molecular.* p. 557. 7ma ed, Elsevier.
- Abraham NM, Jefferson KK. 2010. A low molecular weight component of serum inhibits biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis.* 49: 388-391.
- Aires-de-Sousa M, Parente CE, Vieira-da-Motta O, Bonna IC, Silva DA, de Lencastre H. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *J Appl Environ Microbiol.* 73: 3845-49.
- Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16: 291-304.
- Akers RM, Nickerson SC. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 6: 275-289.
- Alluwaimi AM, Leutenegger CM, Farver TB, Rossitto PV, Smith WL, Cullor JS. 2003. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50: 105-11.
- Almeida R, Matthews K, Cifrian E, Guidry A, Oliver S. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 79: 1021-1026.
- Alva-Murillo N, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet Microbiol.* 155: 324-331.
- Ambroggio MB, Perrig MS, Camussone C, Pujato N, Bertón A, Giannechini E, Alvarez S, Marcipar IS, Calvino LF, Barbagelata MS. 2018. Survey of potential factors involved in the low frequency of CP5 and CP8 expression in *Staphylococcus aureus* isolates from mastitis of dairy cattle from Argentina, Chile, and Uruguay. *J Appl Genet.* 59: 357-363.
- Anderson JC. 1982. Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunisation and therapy. *Vet Rec.* 110: 372-6.
- Andersson UG. 2004. The Immune Response during Acute and Chronic Phase of Bovine Mastitis with emphasis on *Staphylococcus aureus* infection. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae Veterinaria.* 1401-6257.

- Andreotti CS, Baravalle C, Sacco SC, Lovato M, Pereyra EAL, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE. 2017. Characterization of immune response in *Staphylococcus aureus* chronically infected bovine mammary glands during active involution. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 54: 51-60.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* 39: 2151-6.
- Artursson K, Söderlund R, Liu L, Monecke S, Schelin J. 2016. Genotyping of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and correlation to phenotypic characteristics. *Vet. Microbiol.* 193: 156–161.
- Asai K, Kai K, Rikiishi H, Sugawara S, Maruyama Y, Yamaguchi T, Ohta M, Kumagai K. 1998. Variation in CD4C T and CD8C T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet Immunol Immunopathol.* 65: 51-61.
- Atakisi O, Oral H, Atakisi E, Merhan O, Metin Pancarci S, Ozcan A, Marasli S, Polat B, Colak A, Kaya S. 2010. Subclinical Mastitis Causes Alterations in Nitric Oxide, Total Oxidant and Antioxidant Capacity in Cow Milk. *Res Vet Sci.* 89: 10–13.
- Atalla H, Gyles C, Mallard B. 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* 143: 319-328.
- Atalla H, Gyles C, Jacob CL, Moisan H, Malouin F, Mallard B. 2008. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis.* 5:785-799.
- Atalla H, Gyles C, Wilkie B, Leslie K, Mallard B. 2009. Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. *Vet Microbiol.* 12:326-334.
- Atkin KE, MacDonald SJ, Brentnall AS, Potts JR, Thomas GH. 2014. A different path: revealing the function of staphylococcal proteins in *biofilm* formation. *FEBS Lett.* 588: 1869-1872.
- Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, Mateg Ali A, Ghaznavi-Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Chong Seng JS, Nathan JJ, Pei Pei C. 2012. Prevalence of Adhesion and Regulation of *Biofilm*-Related Genes in Different Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol.* 1-10.

- Babra C, Tiwari JG, Pier G, Thein TH, Sunagar R, Sundareshan S, Isloor S, Hegde NR, de Wet S, Deighton M, Gibson J, Costantino P, Wetherall J, Mukkur T. 2013. The persistence of *biofilm*-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. *Folia Microbiol.* 58: 469-74.
- Ballou MA. 2012. Growth and development symposium: Inflammation: Role in the etiology and pathophysiology of clinical mastitis in dairy cows. *J Anim Sci.* 90: 1466-1478.
- Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, Zhao X, Hope JC, Rainard P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 463-72.
- Bannerman DD. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *J Anim Sci.* 87: 10-25.
- Bardiau M, Caplin J, Detilleux J, Graber H, Moroni P, Taminau B, Mainil JG. 2016. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on *biofilm* formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Vet Microbiol.* 185:1-6.
- Bardiau M, Detilleux J, Farnir F, Mainil JG, Ote I. 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 169: 74-79.
- Bardiau M, Yamazaki K, Duprez JN, Taminau B, Mainil JG, Ote I. 2013. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Lett Appl Microbiol.* 57: 181-186.
- Bar-Gal GK, Blum SE, Hadas L, Ehrlich R, Monecke S, Leitner G. 2015. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. *Vet Microbiol.* 176: 143–154.
- Baselga R, Albizu I, De Montserrat C, La Cacho E, Del Barberan M, Amorena B. 1993. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: Implications in Colonization and Virulence. *Infection and immunity.* 61: 4857-4862.
- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun.* 66: 336-342.
- Beccaria C, Silvestrini P, Renna MS, Ortega HH, Calvinho LF, Dallard BE, Baravalle C. 2018. *Panax ginseng* extract reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine

mammary epithelial cells but does not affect macrophages phagocytic activity. *Microb Pathog.* 122: 63-72.

- Benjamin AL, Green BB, Hayden LR, Barlow JW, Kerr DE, 2015. Cow-to-cow variation in fibroblast response to a toll-like receptor 2/6 agonist and its relation to mastitis caused by intramammary challenge with *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 98: 1836–1850.
- Bharathan M, Mullarky IK. 2011. Targeting Mucosal Immunity in the Battle to Develop a Mastitis Vaccine. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16: 409-419.
- Blum JW, Dosogne H, Hoeben D, Vangroenweghe F, Hammon HM, Bruckmaier RM, Burvenich C. 2000. Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 19: 223-235.
- Bochniarz M, Zdzisińska B, Wawron W, Szczubiał M, Dąbrowski R. 2017. Milk and serum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical mastitis caused by coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci.* 100: 9674-9680.
- Boerhout EM, Koets AP, Vernooij JCM, Mols-Vorstermans TGT, Nuijten PJM, Rutten VPMG, Bijlsma JJE, Eisenberg SWF. 2016. Reisolation of *Staphylococcus aureus* from bovine milk following experimental inoculation is influenced by fat percentage and specific immunoglobulin G1 titer in milk. *J Dairy Sci.* 99: 4259-4269.
- Bogni C, Odierno L, Raspanti C, Giraudo J, Larriestra A, Reinoso E, Lasagno M, Ferrari M, Ducrós E, Frigerio C, Bettera S, Pellegrino M, Frola I, Dierer S, Vissio C. 2011. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* 483–494.
- Bouchard D, Peton V, Almeida S, Le Maréchal C, Miyoshi A, Azevedo V, Berkova N, Rault L, François P, Schrenzel J, Even S, Hernandez D, Le Loir Y. 2012. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild bovine mastitis. *J Bacteriol.* 194: 6292-3.
- Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Le Loir Y, Even S. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *J Appl Environ Microbiol.* 79: 877– 885.
- Bouchard L, Blais S, Desrosiers C, Zhao X, Lacasse P. 1999. Nitric Oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J Dairy Sci.* 82: 2574–81.
- Boulanger V, Bouchard L, Zhao X, Lacasse P. 2001. Induction of nitric oxide production by bovine mammary epithelial cells and blood leukocytes. *J Dairy Sci.* 84: 1430-1437.

- Brody T, Yavatkar AS, Lin Y, Ross J, Kuzin A, Kundu, Mukta K, Fann Y, Odenwald WF. 2008. Horizontal gene transfers link a human mrsa pathogen to contagious bovine mastitis bacteria. PLoS ONE. 3: e3074.
- Bröker B, Mrochen D, Péton V. 2016. The T Cell Response to *Staphylococcus aureus*. Pathogens. 5: 31.
- Budd KE, Mitchell J, Keane OM. 2016. Lineage associated expression of virulence traits in bovine-adapted *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol. 30: 24-31.
- Burton JL, Erskine RJ. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 19: 1-45.
- Burvenich C, Bannerman DD, Lippolis JD, Peelman L, Nonnecke BJ, Kehrlí ME, Paape MJ. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. J Dairy Sci. 90:E39-E54.
- Burvenich C, Monfardini E, Mehrzad J, Capuco AV, Paape MJ. 2004. Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis: physiology or pathology? Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België. 66: 97-150.
- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. Vet Res. 34: 521-564.
- Buzás K, Megyeri K, Miczák A, Fekete A, Degré M, Mándi Y, Rosztóczy I. 2004. Different Staphylococcal Strains Elicit Different Levels of Production of t-helper 1-inducing Cytokines. Acta Microbiol Immunol Hung. 51: 371-384.
- Buzzola FR, Alvarez LP, Tuchscher LP, Barbagelata MS, Lattar SM, Calvino LF, Sordelli DO. 2007. Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. Infect Immun. 75: 886-891.
- 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. 74: 3498–3506.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol. 3: 3–8.
- Camussone C, Rejf P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I, Calvino LF. 2012 Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. Braz J Microbiol. 43: 1010-1014.

- Capurro A, Aspán A, Ericsson Unnerstad H, Persson Waller K, Artursson K. 2010. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. J Dairy Sci. 93: 180–191.
- Cha E, Bar D, Hertl JA, Tauer LW, Bennett G, González RN, Schukken YH, Welcome FL, Gröhn YT. 2011. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. J Dairy Sci. 94: 4476-4487.
- Cheng P, Liu T, Zhou WY, Zhuang Y, Peng LS, Zhang JY, Yin ZN, Mao XH, Guo G, Shi Y, Zou QM. 2012. Role of gamma-delta T cells in host response against *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. BMC Immunol. 13:38.
- 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. 40: 1-9.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun. 37: 318-26.
- Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S, Chaponnier C, Lew D, Lacroix JS. 2005. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. J Infect Dis 192: 1023–1028.
- Cocchiari JL, Gomez MI, Risley A, Solinga R, Sordelli DO, Lee JC. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 59: 948-960.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. 1999. The *intercellular adhesion* (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for *biofilm* formation. Infect Immun. 67: 5427-33.
- Craven N, Williams MR. 1985. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. Vet Immunol Immunopathol. 10: 71-127.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in *biofilm* formation. J Bacteriol. 183: 2888–96.
- Cucarella C, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, Penadés JR. 2002. Expression of the *biofilm*-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. Infect Immun. 70: 3180-6.

- Cucarella C, Tormo MA, Ubeda C, Trotonda MP, Monzón M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. 2004. Role of *Biofilm*-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72: 2177.
- Daley JM, Coyle PA, Williams TJ, Fruda G, Dougherty R, Hayes PW. 1991. *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1b and interleukin-2. *J Dairy Sci.* 74: 4413–4424.
- de Haas Y, Veerkamp RF, Barkema HW, Gröhn YT, Schukken YH. 2004. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. *J Dairy Sci.* 87: 95-105.
- De Oliveira AP, Watts JL, Salmon SA, Aarestrup FM. 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J Dairy Sci.* 83: 855-862.
- Denis M, Parlane NA, Lacy-Hulbert SJ, Summers EL, Buddle BM, Wedlock DN. 2006. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 114: 111–120.
- Desiderio JV, Campbell SG. 1980. Bovine mammary gland macrophage: isolation, morphologic features, and cytophilic immunoglobulins. *Am J Vet Res.* 41: 1595–1599.
- Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbuddhe Sukhadeo B, Kurkure Nitin V. 2010. Detection of intercellular adhesion genes and *biofilm* production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun.* 34: 81-89.
- Dieser S, Vissio C, Lasagno M, Bogni C, L A, Odierno L. 2014. Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in argentinean dairy herds. *Pak Vet J.* 34: 124-126.
- Dunne WM. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good *Biofilms* Lately?. *Clin Microbiol Rev.* 15: 155-166.
- Ezzat Alnakip M, Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No I, Caamaño-Antelo S, Calo-Mata P, Barros-Velázquez J. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J Vet Med.* 1-31.
- Faleiro L, Lazebnik Y. 2000. Caspases Disrupt the Nuclear-Cytoplasmic Barrier. *J Cell Biol.* 15: 951–59.
- Felipe V, Morgante CA, Somale PS, Varroni F, Zingaretti ML, Bachetti RA, Correa SG, Porporatto C. 2017. Evaluation of the *biofilm* forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb Pathog.* 104: 278-286.

- Fonseca I, Silva PV, Lange CC, Guimarães MF, Weller MM, Sousa KR, Lopes PS, Guimarães JD, Guimarães SE. 2009. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet Mol Biol.* 32: 776-781.
- Foster TJ y Höök M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6: 484-8.
- Foster TJ. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nature.* 3: 948-958.
- Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, Graber HU. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 85: 439-448.
- Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 79: 672-679.
- Fox LLK, Gay JM. 1993. Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9: 475-487.
- Fraunholz M y Sinha B. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol.* 2: 1-10.
- Geisinger E, Chen J, Novick RP. 2012. Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 194: 2854-64.
- Genestier AL, Michallet MC, Pre´vost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S. 2005. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest.* 115: 3117-3127.
- Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, Götz F. 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem.* 273: 18586-93.
- Gerlier D, Thomasset N. 1986. Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J Immunol Methods.* 94: 57-63.
- Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNIII-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol.* 40: 4060-4067.
- Goldsby RA. 2003. Major histocompatibility complex. *Immunology.* 5ta ed, W.H. Freeman. New York.

- Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M. 2016. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial *biofilms*. *Pathog Dis*. 74: 1–7.
- Götz F. 2002. *Staphylococcus* and *biofilms*. *Molecular microbiology*. 43: 1367-78.
- Graber HU, Naskova J, Studer E, Kaufmann T, Kirchhofer M, Brechbühl M, Schaeren W, Steiner A, Fournier C. 2009. Mastitis-related subtypes of bovine *Staphylococcus aureus* are characterized by different clinical properties. *J Dairy Sci*. 92: 1442-1451.
- Gresham HD, Lowrance J, Caver T, Wilson B, Cheung AL, Lindberg FP. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol*. 164: 3713-3722.
- Grönlund U, Johannisson A, Persson Waller K. 2006. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. *Res Vet Sci*. 80: 147-154.
- Grosz M, Kolter J, Paprotka K, Winkler AC, Schäfer D, Chatterjee SS, Geiger T, Wolz C, Ohlsen K, Otto M, Rudel T, Sinha B, Fraunholz M. 2013. Cytoplasmic replication of *Staphylococcus aureus* upon phagosomal escape triggered by phenol-soluble modulín alpha. *Cell Microbiol*. 6: 451-465.
- Guidry A, Fattom A, Patel A, O'Brien C. 1997. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol*. 59: 53-58.
- Guidry AJ, Fattom A, Patel A, O'Brien CN, Shepherd S, Lohuis J. 1998. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am J Vet Res*. 59: 1537–39.
- Guidry AJ, Paape MJ, Pearson RE. 1980. Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis. *Am J Vet Res*. 41: 751-753.
- Günther J, Koczan D, Yang W, Nürnberg G, Repsilber D, Schuberth HJ, Park Z, Maqbool N, Molenaar A, Seyfert HM. 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with *Escherichia coli*. *Vet Res*. 40: 31.
- Günther J, Petzl W, Bauer I, Ponsuksili S, Zerbe H, Schuberth HJ, Brunner RM, Seyfert HM. 2017. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately after udder infection. *Sci Rep*. 7: 4811.

- Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H. 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Vet Res Commun.* 25: 99-08.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Q.* 29: 18-31.
- Han HR, Pak HI, Kang SW, Jong SS, Youn WJ. 2000. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing *Staphylococcus aureus* strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine development. *J Vet Sci.* 1: 53-60.
- Haslinger-Löffler B, Kahl BC, Grundmeier M, Strangfeld K, Wagner B, Fischer U, Cheung AL, Peters G, Schulze-Osthoff K, Sinha B. 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol.* 7: 1087–1097.
- Hata E, Katsuda K, Kobayashi H, Uchida I, Tanaka K, Eguchi M. 2010. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J Clin Microbiol.* 48: 2130–2139.
- Huijps K, Lam TJGM, Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res.* 75:113–120.
- Haveri M, Hovinen M, Roslöf A, Pyörälä S. 2008. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J Clin Microbiol.* 46: 3728-3735.
- Haveri M, Roslöf A, Rantala L, Pyörälä S. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol.* 103: 993-1000.
- Haveri M, Suominen S, Rantala L., Honkanen-Buzalski T, Pyörälä S. 2005. Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Vet Microbiol.* 106: 97-102.
- Hawari AD, Al-Dabbas F. 2008. Prevalence and Distribution of Mastitis Pathogens and their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Jordan. *J Anim Sci.* 3: 36-39.
- Hebert A, Sayasith K, Sénechal S, Dubreuil P, Lagacé J. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett.* 193: 57-62.
- Hedges JF, Holderness J, Jutila MA. 2016. Adjuvant materials that enhance bovine $\gamma\delta$ T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 181: 30.

- Heikkilä AM, Nousiainen JI, Pyörälä S. 2012. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy Sci.* 95: 139-150.
- Hensen SM, Pavicic MJ, Lohuis JA, Poutrel B. 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dairy Sci.* 83: 418–429.
- Hermann C. 2007. Review: Variability of host—pathogen interaction. *J Endotoxin Res.* 13: 199-218.
- Hernández-Castellano L, Wall SK, Stephan R, Corti S, Bruckmaier R. 2017. Milk somatic cell count, lactate dehydrogenase activity, and immunoglobulin G concentration associated with mastitis caused by different pathogens: A field study, Schweiz. *Arch Tierheilkd.* 159: 283-290.
- Higa F, Kusano N, Tateyama M, Shinzato T, Arakaki N, Kawakami K, Saito A. 1998. Simplified quantitative assay system for measuring activities of drugs against intracellular *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* 36: 1392-1398.
- Hill AW, Shears AL, Hibbitt, KG. 1979. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in newly calved dairy cows. *Res Vet Sci.* 26: 97–101.
- Hogeveen H, Huijps K, Lam TJGM. 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *N Z Vet J.* 59: 16-23.
- Holzbauer S, Chiller T. 2006. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Emerg Infect Dis.* 12: 1180-1180.
- Hu Q, Cui X, Tao L, Xiun L, Wang T, Wang X. 2014. *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in primary bovine mammary epithelial cells through Fas-FADD death receptor-linked caspase-8 signaling. *DNA Cell Biol.* 33:388-397.
- 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.* 197: 191–199.
- Jagielski T, Lassa H, Ahrholdt J, Malinowski E, Roesler U. 2011. Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet Microbiol.* 149: 283–287.
- Jamali H, Barkema HW, Jacques M, Lavallée-Bourget EM, Malouin F, Saini V, Stryhn H, Dufour S. 2018. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J Dairy Sci.* 101: 4729-4746.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. *Immunobiology: The immune system in health and disease.* p. 635. Eds: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Garland Publishing, New York.

- Jensen DL, Eberhart RJ. 1981. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am J Vet Res.* 42: 743-747.
- Jensen K, Günther J, Talbot R, Petzl W, Zerbe H, Schuberth HJ, Glass EJ. 2013. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*-induced mastitis differentially modulate transcriptional responses in neighbouring uninfected bovine mammary gland quarters. *BMC Genomics.* 14: 36.
- Jubb, Kennedy and Palmer's. 2016. *Pathology of Domestic Animals.* Vol 3, p 452-456. 6 ta ed, Maxie Gran. Elsevier Inc. Canada
- Jubrail J, Morris P, Bewley MA, Stoneham S, Johnston SA, Foster SJ, Peden AA, Read RC, Marriott HM, Dockrell DH. 2016. Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. *Cell Microbiol.* 18: 80-96.
- Jungi TW, Weigand PV, Brcic M. 1999. Differential induction of NO synthesis by gram-positive and gram-negative bacteria and their components in bovine monocyte derived macrophages. *Micro Pathog.* 27: 43-53.
- Jutila MA, Holderness J, Graff JC, Hedges JF. 2008. Antigen-independent priming: a transitional response of bovine gammadelta T-cells to infection. *Anim Health Res Rev.* 9: 47.
- Kaiko GE, Horvat J, Beagley KW, Hansbro PM. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?. *Immunology.* 123: 326-38.
- Kauf AC, Vinyard BT, Bannerman DD. 2007. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *ResVet Sci.* 82: 39-46.
- Khoramian B, Jabalameli F, Niasari-Naslaji A, Taherikalani M, Emaneini M. 2015. Comparison of virulence factors and *biofilm* formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microb Pathog.* 88: 73-7.
- Kim Y, Atalla H, Mallard B, Robert C, Karrow N. 2011. Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res.* 7:51.
- Klein RC, Fabres-Klein MH, Brito MA, Fietto LG, Ribon Ade O. 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.* 160: 183-188.

- Klibi A, Jouini A, Gómez P, Slimene K, Ceballos S, Torres C, Maaroufi A. 2018. Molecular Characterization and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* isolates of milk of cows with clinical mastitis in Tunisia. *Microb Drug Resist.* 24: 1210-1216.
- Komine K, Kuroishi T, Komine Y, Watanabe K, Kobayashi J, Yamaguchi T, Kamata S, Kumagai K. 2004. Induction of nitric oxide production mediated by tumor necrosis factor alpha on staphylococcal enterotoxin C-stimulated bovine mammary gland cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 203-10.
- Koziel J, Kmiecik K, Chmiest D, Maresz K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, Mydel P, Potempa J. 2013. The role of Mcl-1 in *S. aureus*-induced cytoprotection of infected macrophages. *Mediators Inflamm.* 2013: 427021.
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 3: e1409.
- Kubota K. 2010. Innate IFN-gamma production by subsets of natural killer cells, natural killer T cells and gammadelta T cells in response to dying bacterial-infected macrophages. *Scand J Immunol.* 71: 199–209.
- Kutar K, Verma AK, Sharma B, Kumar A, Yadav SK. 2015. Analysis of *mecA* Gene and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis.* 36: 22–27.
- Lammers A, Nuijten PJ, Smith HE. 1999. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine. *FEMS Microbiol Lett.* 180: 103-109.
- Lasa I y Penadés JR. 2006. Bap: A family of surface proteins involved in *biofilm* formation. *Res Microbiol.* 157: 99-107.
- Lee J, Takeda S, Livolsi P, Paoletti L. 1993. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 61: 1853-1858.
- Lee JW, Bannerman DD, Paape MJ, Huang MK, Zhao X. 2006. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Vet Res.* 37: 219-29.

- Leitner G, Eligulashvily R, Krifucks O, Perl S, Saran A. 2003. Immune Cell Differentiation in Mammary Gland Tissues and Milk of Cows Chronically Infected with *Staphylococcus aureus*. J Vet Med. 50: 45-52.
- Leitner G, Shoshani E, Krifucks O, Chaffer M, Saran A. 2000. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. J Vet Med B. 47: 581-589.
- Lewandowska-Sabat AM, Boman GM, Downing A, Talbot R, Storset AK, Olsaker I. 2013. The early phase transcriptome of bovine monocyte-derived macrophages infected with *Staphylococcus aureus in vitro*. BMC Genomics. 14: 891.
- Lin Y, Xia L, Turner JD, Zhao X. 1995. Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium *in vitro*. Am J Vet Res. 56: 203-207.
- Löffler B, Tuchscher L, Niemann S, Peters G. 2014. *Staphylococcus aureus* persistence in non-professional phagocytes. Int. J Med Microbiol. 304: 170-176.
- Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. N Engl J Med. 339: 520-532.
- Luedicke C, Slickers P, Ehricht R, Monecke S. 2010. Molecular fingerprinting of *Staphylococcus aureus* from bone and joint infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 29: 457-63.
- Lundberg A, Aspán A, Nyman A, Unnerstad HE, Waller KP. 2014. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. Acta Vet Scand. 56: 2.
- Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". J Leukoc Biol. 92: 753-764.
- Lykkesfeldt J y Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. Vet J. 173: 502-511.
- Maher BM, Mulcahy ME, Murphy AG, Wilk M, O'Keeffe KM, Geoghegan JA, Lavelle EC, McLoughlin RM. 2013. Nlrp-3-driven interleukin 17 production by $\gamma\delta$ T cells controls infection outcomes during *Staphylococcus aureus* surgical site infection. Infect. Immun. 81: 4478.
- Malachowa N, DeLeo FR. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 67: 3057.
- Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wagter L, Wilkie BN. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. J Dairy Sci. 81: 585.

- Marques VF, de Souza MMS, de Mendonça ECL, de Alencar TA, Rocha Pribul B, Coelho SMO, Lasagno M, Reinoso EB. 2013. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 33: 161–70.
- Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H, Goger M, Novick RP, Muir TW. 1999. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 1218.
- McDonald JS, Anderson AJ. 1981. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. *Am J Vet Res.* 42:1366-8.
- McGill JL, Sacco RE, Baldwin CL, Telfer JC, Palmer MV, Waters WR. 2014. The role of gamma delta T cells in immunity to *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 159: 133-143.
- McVey DS, Kennedy MA, Chengappa MM. 2013. *Veterinary microbiology.* p 184-193. 3rd edition, Wiley-Blackwell.
- Melchior MB, Fink-Gremmels J, Gaastra W. 2007. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in *biofilms*. *Vet Microbiol.* 125: 141-149.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. 2006. *Biofilms*: A role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 171: 398-407.
- Melchior MB, van Osch MH, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2009. *Biofilm* formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol.* 137: 83-89.
- Melchior MB, van Osch MH, Lam TJ, Vernooij JC, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2011. Extended *biofilm* susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and *biofilm* susceptibility. *J Dairy Sci.* 94: 5926-5937.
- Melchior MB, van Osch MH, Lam TJ, Vernooij JC, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2011. Extended *biofilm* susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and *biofilm* susceptibility. *J Dairy Sci.* 94: 5926-5937.
- Miller RH, Paape MJ, Fulton LA. 1991. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *J Dairy Sci.* 74: 3782–3790.

- Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, Zerbe H, Blum H. 2010. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics* 11, 138.
- Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, Chow H, Ip M, Jatzwauk L, Jonas D, Kadlec K, Kearns A, Laurent F, O'Brien FG, Pearson J, Ruppelt A, Schwarz S, Scicluna E, Slickers P, Tan H, Weber S, Ehricht R. 2011. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. 6: e17936.
- Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R. 2007. Microarraybased study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet Microbiol*. 125: 128–140.
- Monecke S, Luedicke C, Slickers P, Ehricht R. 2009. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28: 1159–1165.
- Monecke S, Slickers P, Ehricht R. 2008. Assignment of *Staphylococcus aureus* isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 53: 237–251.
- Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle O, Benzman S. 2002. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun*. 70:620-630.
- Moodley A, Stegger M, Bagcigil AF, Baptiste KE, Loeffler A, Lloyd DH, Guardabassi, L. 2006. Spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in the UK and Ireland. *J Antimicrob Chemother*. 58: 1118-1123.
- Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH, Park YH, Joo YS, Koo HC. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *J Dairy Sci*. 90: 1176-1185.
- Mullan NA, Carter EA, Nguyen KA. 1985. Phagocytic and bactericidal properties of bovine macrophages from non-lactating mammary glands. *Res Vet Sci*. 38: 160-6.
- Nagahata H, Kawai H, Higuchi H, Kawai K, Yayou K, Chang CJ. 2011. Altered Leukocyte Responsiveness in Dairy Cows with Naturally Occurring Chronic *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J Vet Med Sci*. 73: 885–894.
- Nickerson SC y Sordillo LM. 2017. Modulation of the bovine mammary gland. p 907-920. 3ra ed, American Dairy Science Association. *Large Dairy Herd Management*.

- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. 2007. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol.* 117: 219–22.
- Notcovich S, DeNicolo G, Flint SH, Williamson NB, Gedye K, Grinberg A, Lopez-Villalobos N. 2018. *Biofilm*-Forming Potential of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Mastitis Cases in New Zealand. *J Vet Sci.* 5:8.
- Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S. 1995. The Agr P2 Operon: An Autocatalytic Sensory Transduction System in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet: MGG.* 248: 446–458.
- Novick RP, Geisinger E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet.* 42:541-564.
- Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* 48:1429-1449.
- O’Riordan K, Lee JC 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 17: 218-234.
- Oliveira M, Bexiga , Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. 2006. *Biofilm*-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 118: 133-140.
- Oliver S P, Gonzalez RN, Hogan JS, Jayarao BM, Owens WE. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4ta. ed, The National Mastitis Council. Estados Unidos.
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 57: 450-460.
- Onoda M y Inano H. 1998. Localization of Nitric Oxide Synthases and Nitric Oxide Production in the Rat Mammary Gland. *J Histochem Cytochem.* 46: 1269-1278.
- Osman KM, El-Enbaawy MI, Ezzeldin NA, Hussein HM. 2010a. Nitric oxide and lysozyme production as an impact to *Clostridium perfringens* mastitis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: 505-511.
- Osman KM, Hassan HM, Ibrahim IM, Mikhail MM. 2010b. The impact of staphylococcal mastitis on the level of milk IL-6, lysozyme and nitric oxide. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: 85-93.

- Ostensson K. 1993. Total and differential leukocyte counts, N-acetyl3-D-glucosaminidase activity, and serum-albumin content in foremilk and residual milk during endotoxin-induced mastitis in cows. *Am J Vet Res.* 54: 213-238.
- Ote I, Taminiau B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 153: 285-292.
- Otto M. 2013. *Staphylococcal* infections: Mechanisms of *biofilm* maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 64:175-188.
- Oviedo-Boyso J, Cortés-Vieyra R, Huante-Mendoza A, Yu HB, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M. 2011. The phosphoinositide-3-kinase-akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infect Immun.* 70: 4569-4577.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J Infect.* 54:399-409.
- Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res.* 34: 597-627.
- Paape MJ, Shafer-Weaver K, Capuco AV, Van Oostveldt K, Burvenich C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv Exp Med Biol.* 480: 259.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. 1993. Suppression of proliferative responses of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 36: 137-151.
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G, Day NP. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 70: 4987-96.
- Pereyra EA, Picech F, Renna MS, Baravalle C, Andreotti CS, Russi N, Calvinho LF, Diez C, Dallard BE. 2016. Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and *biofilm*-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* 183: 69–77.
- Pereyra EAL, Dallarda BE, Calvinho LF. 2014. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Rev Argent Microbiol.* 46: 363-375.

- Pereyra EAL, Sacco SC, Duré A, Baravalle C, Renna MS, Andreotti, CS, Calvino, LF, Dallard BE. 2017. Immune response of *Staphylococcus aureus* strains in a mouse mastitis model is linked to adaptive capacity and genotypic profiles. *Vet Microbiol.* 204: 64-76.
- Pereyra EAL. 2015. Tesis Doctoral. Mecanismos inmunológicos que intervienen en la infección de la glándula mamaria bovina por *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional del Litoral. p 146.
- Periasamy S, Joo AC, Duong T, Bach VY, Tan SS, Chatterjee G, Cheung YC, Otto M. 2012. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 1281–1286.
- Persson K, Larsson I, Hallén Sandgren C. 1993. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. *Vet Immunol Immunopathol.* 37: 99-112.
- Persson Y, Nyman AK, Grönlund-Andersson U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 53: 36.
- Petzl W, Zerbe H, Günther J, Yang W, Seyfert HM, Nürnberg G, Schuberth HJ. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Research.* 39:18.
- Petzl W1, Zerbe H, Günther J, Seyfert HM, Hussen J, Schuberth HJ. 2018. Pathogen-specific responses in the bovine udder. Models and immunoprophylactic concepts. *Res Vet Sci.* 116: 55-61.
- Pham CTN. 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 6: 541-550.
- Piccinini R, Borromeo V, Zecconi A. 2010. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet microbiol.* 145: 100-5.
- Piccinini R, Tassi R, Daprà V, Pilla R, Fenner J, Carter B, Anjum MF. 2012. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *J Dairy Res.* 79: 249-255.
- Plattner BL, Hostetter JM. 2011. Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle. *Vet Med Int.* 214384.
- Plommet M y Le Gall A. 1963. Staphylococcal mastitis of sheep. III. Research on antitoxic and antimicrobial immunity. *Annales De l'Institut Pasteur.* 104: 779–796.

- Pöhlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Döring G, Lee JC, Fournier JM, Botzenhart K, Wolz, C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect Immun.* 68: 4865-4871.
- Pomeroy B, Sipka A, Hussen J, Eger M, Schukken Y, Schuberth HJ. 2017. Counts of bovine monocyte subsets prior to calving are predictive for postpartum occurrence of mastitis and metritis. *Vet Res.* 48:13.
- Poutrel B, Boutonnier A, Sutra L, Fournier JM. 1988. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J Clin Microbiol.* 26: 38–40.
- Price SJ y Hope JC. 2009. Enhanced secretion of interferon-gamma by bovine gamma delta T cells induced by coculture with Mycobacterium bovis-infected dendritic cells: evidence for reciprocal activating signals. *Immunology.* 126: 201.
- Qazi SN, Counil E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Winzer K, Chan WC, Williams P, Hill PJ. 2001. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun.* 69: 7074-7082.
- Quinn MT, Ammons MC, Deleo FR. 2006. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin Sci Lond.* 111: 1–20.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S. 2015. Concise review of veterinary microbiology. p. 36-38. 2nd edition. Wiley-Blackwell.
- Rabello RF, Moreira BM, Lopes RM, Teixeira LM, Riley LW, Castro AC. 2007. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *J Med Microbiol.* 56: 1505–1511.
- Rainard P y Riollot C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research.* 37:369-400.
- Rainard P, Foucras G, Fitzgerald JR, Watts JL, Koop G, Middleton JR. 2017. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound Emerg Dis.* 65: 149-165.
- Rainard P, Poutrel B, Caffin JP. 1984. Assessment of hemolytic and bactericidal complement activities in normal and mastitic bovine milk. *J Dairy Sci.* 67: 614-619.
- Rainard P. 2003. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Vet Res.* 34: 647-670.

- Rainard P. 2007. *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM/F' is secreted and stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary infection. *Vet Res.* 38: 685-96.
- Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP. 1986. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *MGG.* 202: 58-61.
- Reffuveille F, Josse J, Vallé Q, Mongaret C, Gangloff SC. 2017. *Staphylococcus aureus* *Biofilms* and their Impact on the Medical Field. The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *InTech.* 187-214.
- Reinoso EB, El-Sayed A, Lämmler C, Bogni C, Zschöck M. 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol Res.* 163: 314–22.
- Renna MS, Pereyra EA, Baravalle C, Camussone CM, Dallard BE, Marcipar IS,Calvinho LF. 2014. Functional role of antibodies generated in heifers through immunization with *Staphylococcus aureus* vaccines in invasion and phagocytosis assays. *FEMS Microbiol Lett.* 360: 62-69.
- Renna MS, Silvestrini P, Beccaria C, Baravalle C, Engler C, Pereyra EA, CalvinhoLF, Dallard BE. 2019. Effects of chronic *Staphylococcus aureus* infection on immunological parameters and functionality of macrophages isolated from bovine mammary secretions. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* Manuscrito aceptado.
- Renna MS, Figueredo CM, Rodríguez-Galán MC, Icely PA, Peralta Ramos JM, Correa SG, Sotomayor CE. 2012. Abrogation of spontaneous liver tolerance during immune response to *Candida albicans*: contribution of NKT and hepatic mononuclear cells. *Int Immunol.* 24: 315-25.
- Rinaldi M, Li RW, Capuco AV. 2010. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 138: 267-279.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv Exp Med Biol.* 480: 247–258.
- Riollet C, Rainard P, Poutrel B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J Dairy Sci.* 84: 1077-1084.
- Rivas AL, Quimby FW, Coksaygan O, Olmstead L, Lein DH. 2000. Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res.* 64: 232–237.

- Rivas AL, Tadevosyan R, Quimby FW, Lein DH. 2002. Blood and milk cellular immune responses of mastitic non-periparturient cows inoculated with *Staphylococcus aureus*. Can J Vet Res. 66: 125-131.
- Roberson JR, Fox LK, Hancock O, Gay JM. 1994. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci .77: 3354-3364.
- Rooijackers SHM, van Wamel WJB, Ruyken M, van Kessel KPM, van Strijp JAG. 2005. Anti-opsonic properties of staphylokinase. Microbes Infect. 7: 476-484.
- Ruegg PL. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci. 100: 10381-10397.
- Russi NB, Bantar C, Calvinho LF. 2008. Sensibilidad a los antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* causantes de mastitis bovina en rodeos lecheros de Argentina. Revista argentina de microbiología. 40: 116-119.
- Ryman VE, Packiriswamy N, Sordillo LM. 2015. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. Anim Health Res Rev. 16: 135-149.
- Sakwinska O, Morisset D, Madec JY, Waldvogel A, Moreillon P, Haenni M. 2011. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhône Valley. Appl Environ Microbiol. 77: 3428–3432.
- Salasia SIO, Khusnan Z, Lammler C, Zschock,M. 2004. Comparative studies on pheno and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. J Vet Sci. 5: 103-109.
- Salimena APS, Lange CC, Camussone C, Signorini M, Calvinho LF, Brito MAVP, Borges CAV, Guimarães AS, Ribeiro JB, Mendonça LC, Piccoli RH. 2016. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and *Biofilm* formation in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected from Brazilian dairy farms. Vet Res Commun. 40: 97–106.
- Sandholm M, Helsingin Y. 1995. The bovine udder and mastitis. p. 312. Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki.
- Schalm OW, Carroll EJ, Jain NC. 1971. Bovine Mastitis. p. 360. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Schönborn S, Krömker V. 2016. Detection of the *biofilm* component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. Vet Microbiol. 30: 126-128.

- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN, Seyfert HM; members of the Pfizer mastitis research consortium. 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 144: 270-289.
- Schukken YH, Hertl J, Bar GD, Bennett J, González RN, Rauch BJ, Santisteban C, Schulte HF, Tauer L, Welcome FL. 2009. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 3091–3105.
- Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA, Mallard BA, Lumsden JH, Dick PC, Vessie GH, Kehrl ME. 1999. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. *J Dairy Sci.* 82: 2393–2401.
- Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res.* 34: 579-596.
- Schultze WD, Bright SC. 1983. Changes in penetrability of bovine papillary duct to endotoxin after milking. *Am J Vet Res.* 44: 2373-2375.
- Sendi P, Proctor RA. 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* 17: 54-58.
- Seo YS, Lee DY, Rayamahji N, Kang ML, Yoo HS. 2008. *Biofilm*-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Res Vet Sci.* 85: 433-438.
- Serhan CN, Savill J. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 6: 1191–1197.
- Shafer-Weaver KA, Sordillo LM. 1997. Bovine CD8C suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet Immunol Immunopathol.* 56: 53-64.
- Shafer-Weaver, KA, Sordillo LM. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 79: 1347-1352.
- Shiferaw S, Munees A. 2016. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* from lactating cows milk in bahir dar dairy farms. *Afr J Microbiol Res.* 10: 1444–1454.

- Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. 2003. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *J Clin Microbiol.* 41: 456-9.
- Shoshani E, Leitner G, Hanochi B, Saran A, Shpigel NY, Berman A. 2000. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J Dairy Res.* 67: 155–169.
- Shuster DE, Kehrl Jr ME, Rainard P, Paape M. 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:3286-3292.
- Signorini M, Sequeira G, Bonazza J, Santina R, Martí L, Frizzo L, Rosmini M. 2008. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 18: 207-217.
- Silanikove N, Shapiro F, Leitner G, Merin U. 2005. Subclinical mastitis affects the plasmin system, milk composition and curd yield in sheep and goats: comparative aspects. In: *Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions.* p. 511-516. H. Hogeveen, ed, Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- Sinha B, Fraunholz M. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Zentralbl Bakteriologie.* 300: 170-175.
- Skyberg JA, Thornburg T, Rollins M, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW. 2011. Murine and bovine $\gamma\delta$ T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections. *PLoS One.* 6:21978.
- Sladek Z, Rysanek D, Faldyna M. 2005. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland neutrophils in vitro. *Vet Med Czech.* 50:11-23.
- Slama P, Sladek Z, Rysanek D, Langrova T. 2009. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland lymphocytes. *Res Vet Sci.* 87:233-238.
- Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Dowson CG. 2005. Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 43: 4737–4743.
- Smolenski GA, Wieliczko RJ, Pryor SM, Broadhurst MK, Wheeler TT, Haigh BJ. 2011. The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 143: 125-30.

- Smyth DS, Feil EJ, Meaney WJ, Hartigan PJ, Tollersrud T, Fitzgerald JR, Enright MC, Smyth CJ. 2009. Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 58: 1343–1353.
- Soares BS, Melo DA, Motta CC, Marques VF, Barreto NB, Coelho SMO, Coelho IS. 2017. Characterization of virulence and antibiotic profile and Agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovine in state of Rio de Janeiro. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 69: 843–50.
- Sol J, Sampimon OC, Barkema HW, Schukken, YH. 2000. Factors Associated with Cure after Therapy of Clinical Mastitis Caused by *Staphylococcus aureus*. J Dairy Sci. 83: 278-284.
- Soltys J, Quinn MT. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. Infect Immun. 67: 6293-6302.
- Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC. 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. J Clin Microbiol. 38: 846-850.
- Sordillo LM, Nickerson SC, Akers RM, Oliver SP. 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. Int J Biochem Cell Biol. 19: 1165-1172.
- Sordillo LM, Nickerson SC. 1988. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. Am J Vet Res. 49:1112-20.
- Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Symposium: bovine immunology. Immunobiology of the mammary gland. J Dairy Sci. 80:1851-1865.
- Sordillo LM, Streicher KL. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 7: 135-46.
- Sordillo LM. 2018. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 34: 507-523.
- Spiegel MR. 1991. Probabilidad y estadística. Editorial McGraw Hill. Buenos Aires.
- Srednik ME, Usongo V, Lépine S, Janvier X, Archambault M, Gentilini ER. 2018. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mastitis bovine milk in Argentina. J Dairy Res. 85: 57–63.
- Stepanovic S, Vukovic D, HolaV, Bonoaventura, G, Djukic S, Cirrovic Ivana, Ruzicka F. 2007. Quantification of *biofilm* in microtiter plates: overview of testing conditions and

practical recommendations for assessment of *biofilm* production by staphylococci. J Comp APMIS. 115: 891- 899.

- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. *Biofilms* as Complex Differentiated Communities. Annual Review of Microbiology. 56: 187-209.
- Stringfellow W, Dassy B, Lieb M, Fournier J. 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. Appl Environ Microbiol. 57: 618-621.
- Suleiman AB, Kwaga JKP, Umoh VJ, Okolocha EC, Muhammed M, Lammler C, Shaibu SJ, Akineden O, Weiss R. 2012. Macro-restriction analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Nigeria. Afr J Microbiol Res. 6: 6270-6274.
- Sung JM, Lloyd DH, Lindsay JA. 2008. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. Microbiology. 154: 1949–1959.
- Szweda P, Schielmann M, Kotlowski R, Gorczyca G, Zalewska M, Milewski S. 2012. Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol Biotechnol. 96: 1157-1174.
- Targowski SP, Niemialtowski M. Cytotoxic and Blocking Effect of Bovine Colostrum. Zoonoses and Public Health. 35: 1-10
- Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, Scott JL. 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8C. Cell Immunol. 156: 245-253.
- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, MurrayB, Persing D, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239.
- Thompson-Crispi K, Atalla H, Miglior F, Mallard BA. 2014. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. Front immunol. 5: 493.
- Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, Engebretsen IL, Bayles KW, Horswill AR, Kielian T. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation *in vivo*. J Immunol. 186: 6585-6596.
- Tizard IR. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. 8° ed, Elsevier. España.
- Tollersrud T, AH Kampen, K Kenny. 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. 74: 3507–3512.
- Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ Jr, Lee JC. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other

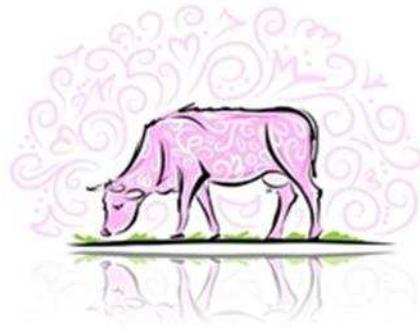
- Staphylococcus* Spp. from Europe and the United States. J Clin Microbiol. 38: 2998–3003.
- Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. 2005. Bap-dependent *Biofilm* formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. Microbiology. 151: 2465–75.
 - Tuchscher L, Bischoff M, Lattar SM, Noto Llana M, Pfortner H, Niemann S, Geraci J, Van de Vyver H, Fraunholz MJ, Cheung AL, Herrmann M, Völker U, Sordelli DO, Peters G, Löffler B. 2015. Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. PLoS Pathog. 11: e1004870.
 - Tuchscher L, Heitmann V, Hussain M, Viemann D, Roth J, von Eiff C, Peters G, Becker K, Löffler B. 2010a. *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Adapted Phenotypes for Intracellular Persistence. J Infect Dis. 202: 1031-1040.
 - Tuchscher LP, Gomez MI, Buzzola FR, Calvino LF, Lee JC, Sordelli DO. 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 75: 5483-5488.
 - Tuchscher LP, Löffler B, Buzzola FR, Sordelli DO. 2010b. *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. Future Microbiol. 5: 1823-1832.
 - Tuchscher LPN, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, Sordelli DO. 2005. Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. Infect Immun. 73: 7932-7937.
 - Turk R, Koledić M, Maćešić N, Benić M, Dobranić V, Đuričić D, Cvetnić L, Samardžija M. 2017. The role of oxidative stress and inflammatory response in the pathogenesis of mastitis in dairy cows. Mljekarstvo. 67: 91-101.
 - Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B. 2010. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk. Zoonoses and Public Health. 57: 197-203.
 - Turutoglu H, Hasoksuz M, Ozturk D, Yildirim M, Sagnak S. 2009. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their mecA genes. Vet Res Commun. 33: 945-956.
 - Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C, Trotonda P, Foster TJ, Lasa I, Penadés JR. 2003. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. Mol Microbiol. 49: 193-210.

- Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, Lasa I. 2012. Bap, a *Biofilm* matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. PLoS Pathog. 8: e1002843.
- van den Borne BH, Nielen M, van Schaik G, Melchior MB, Lam TJ, Zadoks RN. 2010. Host adaptation of bovine *Staphylococcus aureus* seems associated with bacteriological cure after lactational antimicrobial treatment. J Dairy Sci. 93: 2550–2558.
- van Duijkeren E, Hengeveld PD, Albers M, Pluister G, Jacobs P, Heres L, van de Giessen AW. 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* in dairy cattle. Vet Microbiol. 171: 364-7.
- Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. 2010. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in belgian cows. Vet Microbiol. 144: 166–171.
- Vangroenweghe F, Duchateau L, Burvenich C. 2004a. Moderate inflammatory reaction during experimental *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. J Dairy Sci. 87: 886–895.
- Vangroenweghe F, Rainard P, Paape M, Duchateau L, Burvenich C. 2004b. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. J Dairy Sci. 87: 4132–4144.
- Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for *biofilm* formation. Vet Microbiol. 92: 179–85.
- Veh KA, Klein RC, Ster C, Keefe G, Lacasse P, Scholl D, Roy JP, Haine D, Dufour S, Talbot BG, Ribon AOB, Malouin F. 2015. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J Dairy Sc. 98: 155-168.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken C, Reutelingsperger C. 1995. A Novel Assay for Apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. J Immunol Methods. 184: 39–51.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. J Immunol Methods. 243: 167–90.
- Vissio C, Aguero DA, Raspanti CG. 2015. Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina. Arch med vet. 47: 7-14.

- von Eiff C, Becker K, Metze D, Lubritz G, Hockmann J, Schwarz T, Peters G. 2001. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. Clin Infectious Dis: Off Publ Infectious Dis Soc Am. 32: 1643–1647.
- Waller KP. 2000. Mammary Gland Immunology Around Parturition. Biology of the Mammary Gland. 480:231-245.
- Wang D, Wang Z, Yan Z, Wu J, Ali T, Li J, Lv Y, Han B. 2015. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. Infect Genet Evol. 31: 9-16.
- Wang XS, Li L, Huang LP, Chen J. 2010. Adsorption of Cr(VI) from aqueous solutions by *Staphylococcus aureus* biomass. Clean: soil, air, water. 38: 500-505.
- Wellnitz O, Berger U, Schaeren W, Bruckmaier R. 2012. Mastitis severity induced by two *Streptococcus uberis* strains is reflected by the mammary immune response *in vitro*. Schweiz Arch Tierheilkd. 154: 317-323.
- Wellnitz O, Bruckmaier RM. 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. Vet J. 192: 148-152.
- Whelehan CJ, Meade KG, Eckersall PD, Young FJ, O'Farrelly C. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces regionspecific changes in innate immune gene expression. Vet Immunol Immunopathol. 140: 181–189.
- Wolter W, Castañeda VH, Kloppert B, Zschoeck M. 2004. La mastitis bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara.
- Wong GG, Clark SC. 1988. Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. Immunol Today. 9: 137-139.
- Wu X, Wang Y, Tao L. 2011. Sulfhydryl compounds reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation by inhibiting PIA biosynthesis. FEMS Microbiol Lett. 316: 44-50.
- Yarwood JM, Schlievert PM. 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. J Clin Invest. 112: 1620-1625.
- Zachary JF. 2016. Pathology of Domestic Animals. p 1183-1187. 6ta ed. Elsevier. Missouri.
- Zecconi A, Calvinho L, Fox L. 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. Bull Int Dairy Fed. 408: 39.
- Zecconi A, Scali F. 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunol Lett. 150: 12-22.

- Zetterlund A, Larsson PH, Mjller-Suur C, Palmberg L, Larsson K. 1998. Budesonide but not terbutaline decreases phagocytosis in alveolar macrophages. *Respir Med.* 92: 162–66.
- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *J Animal Sci.* 13: 57-65.
- Zhu L, Zou F, Yan Y, Wang Q, Shi Y, Qu W. 2016. The Characteristics of *Staphylococcus aureus* small colony variant isolated from chronic mastitis at a dairy farm in Yunnan province, China. *Sci World J.* 1-8.

8 Anexos



8.1. Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones.

8.1.1. Microbiología.

- ▶ Columbia agar base. Britania. Tripteína 10 g/l; Peptona de carne 5 g/l; NaCl 5 g/l; Extracto de levadura 5 g/l; Extracto de corazón 3 g/l; Almidón 1 g/l; Agar 15 g/l.
- ▶ Tripteína soya caldo (TSC). Britania. Tripteína 17 g/l; Peptona de soya 3 g/l; NaCl 5 g/l; Fosfato dipotásico 5 g/l; Glucosa 3 g/l.
- ▶ Agar manitol salado (AMS). Britania. Tripteína 5 g/l; Extracto de carne 1 g/l; NaCl 75 g/l; Peptona de carne 5 g/l; Rojo de fenol 0.025 g/l; Agar 15 g/l.
- ▶ Agar sangre. Preparación propia. Columbia agar base (Britania); suplementado con sangre bovina 5 % (V/V).
- ▶ Buffer fosfato salino (PBS 1X). NaCl 8 g; Solución Stock (PBS 10X) 100 ml; en 1.000 ml de agua destilada. Preparación propia.
- ▶ Solución fisiológica 0,9%. Roux-Ocefa S.A./Droguería Casandra.
- ▶ Hipoclorito de Sodio 5.6%. Uso doméstico.
- ▶ Solución stock PBS 10X. Na₂HPO₄ (Na Fosfato Dibásico Anhidro) 11,4 g (o Na₂HPO₄ 12 H₂O) 28,75 g; NaH₂PO₄·2H₂O (Na Fosfato Monobásico Anhidro) 3,3 g; (o NaH₂PO₄) 2,54 g; Agua destilada 1.000 ml. Preparación propia.

8.1.2. Electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE).

- ▶ Tris-HCL (10mM, pH8). Tris base 12,1% P/V. Preparación propia.
- ▶ Lisozima. Genbiotech S.R.L. Lisozima (50 mg/ml) de H₂O miliq estéril.
- ▶ Proteinasa K. Genbiotech S.R.L. Proteinasa K (20 mg/ml).
- ▶ Buffer de lisis (pH8). Tris-HCl 50 mM; 1% P/V SDS; 100 mM EDTA. Preparación propia.
- ▶ Solución PIV. NaCl 1 M; Tris-HCl (pH 8) 10 mM. Preparación propia.
- ▶ Agarosa low melting 1,5 % P/V. Bio Rad.
- ▶ Buffer EC. Tris-HCl (pH 8) 6 mM; NaCl 1 M; EDTA (pH 8) 100 mM; Deoxicolato de sodio 0,2%; laurilsarcosina de sodio 0,5%; Brij-58 0,5%. Preparación propia.
- ▶ Buffer EC-Lisis. Buffer EC 1X; ARNasa A 5µg/mL; Lisozima 100 µg/mL; Lisostafina 10 µg/mL. Preparación propia.

- ▶ Buffer ES. EDTA (pH 9) 0,5 M; Laurilsarcosina de sodio 0,5% P/V. Preparación propia.
- ▶ Buffer ES-P. Buffer ES 1X; Proteinasa K 0,05%P/V. Preparación propia.
- ▶ Buffer TE. Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM; EDTA (pH 8) 1 mM. Preparación propia.
- ▶ Buffer Pre-SmaI 1X. Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM; EDTA (pH 8) 1 mM. Preparación propia.
- ▶ Mezcla de restricción. Buffer Pre-SmaI 1X; 15 U/plug de SmaI. Preparación propia.
- ▶ Buffer loading 6X. Glicerol 30%V/V; Azul de bromofenol 0,25%V/V. Preparación propia.
- ▶ Buffer TBE 10X. Tris base 890 mM; Ácido Bórico 890 mM; EDTA (pH 8) 20 mM. Preparación propia.
- ▶ Buffer TBE 0,5X. Dilución 1/20 del TBE 10X. Preparación propia.
- ▶ Agarosa calidad PFGE 1%P/V. Bio Rad.

8.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- ▶ GelRed TM- Nucleic Acid. Biotium.
- ▶ Ultrapure TM Agarose. Invitrogen TM.
- ▶ Buffer TAE 1X pH 8. Tris-Acetato-EDTA (TAE 40X) 10ml; 490 ml agua destilada. Preparación propia.
- ▶ Tris-Acetato-EDTA (TAE 40X). 40 mM tris (pH 7.6), 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA. Preparación propia.

8.1.4. Cultivos celulares.

- ▶ Medio completo MAC-T. Medio DMEM 1X + GlutaMAX (Gibco® de Thermofisher) 83 ml; Medio RPMI 1640 1X (Gibco® 83 ml; Suero fetal bovino inactivado (internegocios) 20 ml; Dexametasona 5 µg/ml (Sidus) 250 µl; Insulina bovina 5 µg/ml (Corrientes) 200 µl; L-glutamina 100X (EMEVE Medios) 2ml; HEPES 1M (Gibco® 8 ml; Piruvato de Sodio 100 mM (Gibco®) 2 ml; Penicilina-Estreptomicina 2 ml. Preparación propia.
- ▶ Medio DMEM/RPMI. DMEM 1X + GlutaMAX (Gibco®) 50%; RPMI 1640 (1X Gibco®) 50%. Preparación propia.

- ▶ Tritón 0.025%. 50 µl de tritón 100X (Cicarelli® Laboratorios); 200 ml de agua ultrapura estéril. Preparación propia.
- ▶ Medio DMEM/RPMI con gentamicina. DMEM 1X + GlutaMAX (GIBCO®) 50%; RPMI 1640 (1X Gibco®) 50%; suplementado con 300 µg/ml de gentamicina (OVER). Preparación propia.
- ▶ Medio completo MAC-T con gentamicina. Medio completo MAC-T, se suplementa únicamente con 300 µg/ml de gentamicina (OVER) como antibiótico. Preparación propia.
- ▶ Medio de cultivo para macrófagos. Medio RPMI 1640 (1X Gibco®) 88 ml; Suero fetal bovino inactivado (Internegocios) 10 ml; L-glutamina 100X (EMEVE Medios) 1 ml; Penicilina-Estreptomicina 1 ml. Preparación propia.
- ▶ Medio de cultivo para macrófagos sin antibiótico. Medio RPMI 1640 (1X Gibco®) 88 ml; Suero fetal bovino inactivado 10% (Internegocios) 10 ml; L-glutamina 100X (EMEVE Medios) 1 ml. Preparación propia.
- ▶ Medio de cultivo para macrófagos suplementado con gentamicina. Medio RPMI 1640 (1X GIBCO®) 88ml; Suero fetal bovino inactivado (Internegocios) 10 ml; L-glutamina 100X (EMEVE Medios) 1 ml; 300 µg/ml de gentamicina (OVER). Preparación propia.
- ▶ Buffer de lisis (pH 7,4). NH₄Cl (0,15 M) 8,29 gr; NaHCO₃ (1mM) 1 gr; EDTA disódica (0,1µM) 0,0372 mg; 1000 ml agua ultrapura. Preparación propia.

8.1.5. ELISA.

- ▶ Lisado de *S. aureus*. Las cepas de *S. aureus* 806 (T) y 5011 (P) fueron reactivadas mediante siembra en estrías en medio CAB y fueron incubadas por 24 hs a 35-37°C. A partir del cultivo en medio sólido, se levantaron cinco colonias aisladas y de similar morfología, y se homogeneizaron en 5 ml de TSC. La suspensión se incubó aproximadamente 16 hs a 37 °C y a 150 rpm de agitación. A partir de este cultivo líquido, se realizó una dilución 1/100 (4950 µl de TSC y 50 µl del cultivo líquido) y se incubó a 37°C por 2 hs, a 150 rpm de agitación. Se largaron aproximadamente 16 cultivos líquidos de 2 hs para alcanzar una concentración bacteriana total de 1×10^{10} cel/ml. Finalizadas las 2 hs de incubación, se colectaron los cultivos en un tubo falcón de 50 ml y se centrifugo 15 min a 10.000 rpm. El pellet bacteriano obtenido se resuspendió en 10 ml de PBS 1X estéril

conteniendo 35 U de lisostafina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incubó a 37°C en agitación (100 rpm) monitoreando la pérdida de turbidez del cultivo midiendo periódicamente la absorbancia a una DO de 600. Una vez que se alcanzó la lisis bacteriana en el cultivo, se inactivó la lisostafina en un baño de agua a 75°C durante 15 min, se enfrió la suspensión y se eliminaron las bacterias intactas filtrando la solución con un filtro de 0,2- μm

- ▶ D-PBS: 0,96 gr de fosfato de sodio 0,008 M (Cicarelli), 0,27 gr de fosfato de potasio 0,002 M (Cicarelli), 8,18 gr de cloruro de sodio 0,14 M (Cicarelli), 0,75 gr de cloruro de potasio 0,01 M (Anedra), en 1 lt de agua ultrapura, pH 7,4.
- ▶ Buffer carbonato-bicarbonato: bicarbonato-carbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4. 1,5 gr de carbonato de sodio (Cicarelli) y 3 gr de bicarbonato de sodio (Biopack) en 250 ml de agua ultrapura.
- ▶ Buffer de bloqueo: 2 gr de albúmina sérica bovina (BSA, 4%, Sigma-Aldrich®), 2,5 gr de sacarosa (5%, Fluka) en 50 ml de D-PBS, filtrado a 0,45 μm (filtro, MC-PES-04S, Microclar).
- ▶ Diluyente: 2 gr de albúmina sérica bovina (BSA, 4%, Sigma-Aldrich®), en 50 ml de D-PBS (pH 7,4).
- ▶ Buffer de lavado: 500 μl de detergente Tween-20 (0.05%, Cicarelli) en 1 lt de D-PBS.

8.2. Anexo 2: Tablas.

Tabla 1. Procedencia y características epidemiológicas de las cepas de *S. aureus* transitorias y persistentes seleccionadas.

<i>Cepas de S. aureus</i>	<i>Presentación clínica</i>	<i>RCS (cél/ml)</i>	<i>Prevalencia de mastitis en el establecimiento (%)</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Información complementaria</i>
3	T-C	s/d	s/d	SF	Se aisló 1 vez y no se volvió a aislar. Procedente de un tambo de alta prevalencia de mastitis clínicas.
8*	T-C	s/d	s/d	s/d	s/d
14	T-C	s/d	s/d	SF	Se aisló 1 vez y no se volvió a aislar. Procedente de un tambo de alta prevalencia de mastitis clínicas.
17*	T-C	591.000	62	SF	Elevada difusión en el rodeo. Se aisló la misma cepa con idéntico pulsotipo al PFGE a partir de 3 muestras al azar tomadas el mismo día en diferentes animales con signos de la enfermedad.
20	T-SC	s/d	24,8	SF	Cepa aislada de una IIM de una vaca en lactancia.
25*	T-C	s/d	s/d	SF	s/d
37	T-SC	s/d	24,8	SF	Cepa aislada de una IIM de una vaca en lactancia.
48*	T-C	279.000	7	SF	s/d
61*	T-C	s/d	s/d	SF	s/d
110*	T-C	s/d	s/d	SF	s/d
117*	T-C	591.000	62	C	s/d
126	T-SC	s/d	s/d	SF	Cepa posiblemente no tipificable para <i>cap5</i> y <i>cap8</i> .
127	T-SC	s/d	s/d	SF	Cepa posiblemente no tipificable para <i>cap5</i> y <i>cap8</i> .
133*	T-C	s/d	s/d	SF	s/d
157	T-C	s/d	s/d	SF	Cepa posiblemente no tipificable para <i>cap5</i> y <i>cap8</i> .
164	T-C	s/d	s/d	SF	Cepa posiblemente no tipificable para <i>cap5</i> y <i>cap8</i> .
179	T-SC	s/d	s/d	SF	Cepa posiblemente no tipificable para <i>cap5</i> y <i>cap8</i> .

209	T-SC	s/d	s/d	SF	Cepa no tipificable para <i>cap5</i> y <i>cap8</i> . Elevada difusión en el rodeo. Se aisló la misma cepa con idéntico pulsotipo al PFGE a partir de 3 muestras al azar tomadas el mismo día en diferentes animales con signos de la enfermedad.
247*					
	T-C	591.000	62	C	
293*	T-C	s/d	s/d	C	s/d
322*	T-C	s/d	s/d	C	s/d
350					Cepa aislada de una IIM de una vaquillona pre-parto.
	T-SC	s/d	34,5	SF	
358*	T-C	s/d	s/d	BA	s/d
364 *	T-C	591.000	62	BA	s/d
731	T-SC	s/d	24,7	SF	Cepa aislada de una IIM de una vaca en lactancia. La cepa fue aislada una vez y luego del tratamiento con antibióticos no se volvió a aislar.
806	T-SC	s/d	s/d	SF	Cepa proveniente de un tambo con alta prevalencia de mastitis y elevados RCS en leche de tanque.
O37	P-SC	s/d	s/d	SF	
316*	P-SC	400.000	1 a 3	SF	s/d
397*	P-SC	s/d	s/d	SF	s/d
662	P-SC	s/d	s/d	SF	Cepa proveniente de un tambo con alta prevalencia de mastitis y elevados RCS en leche de tanque.
1570*	P-SC	400.000	1 a 3	SF	s/d
1595*	P-SC	400.000	1 a 3	SF	La cepa aislada pre y post-tratamiento antibiótico fue el mismo pulsotipo.
5011*	P-SC	400.000	1 a 3	SF	s/d
5128*	P-SC	400.000	1 a 3	SF	s/d

(T): Transitoria; (P): Persistente; (C): Clínica; (SC): Subclínica; (SF): Santa Fe, Argentina; (BA): Buenos Aires, Argentina; (C): Córdoba, Argentina; s/d: sin datos; IIM: infección intramamaria; PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado; RCS: recuento de células somáticas.

*Cepas utilizadas en la tesis doctoral de Pereyra EAL, (2015).

Tabla 2. Pares de cebadores (primers) utilizados para la amplificación de la secuencia nucleotídica de interés (PCR).

Primer	Secuencia (5'-3')	Gen que amplifica	Pares de bases	Referencia
<i>Cap5k1</i>	5'-GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG-3'	<i>Capsular polysaccharide 5</i>	361 pb	(Verdier y col., 2007)
<i>Cap5k2</i>	5'-ACTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATAACAG-3'			
<i>Cap8k1</i>	5'-GCCTTATGTTAGGTGATAAACC-3'	<i>Capsular polysaccharide 8</i>	173 pb	(Verdier y col., 2007)
<i>Cap8k2</i>	5'-GGAAAACACTATCATAGCAGG-3'			
<i>agrI</i>	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	<i>Accessory gene regulator I</i>	441 pb	(Gilot y col., 2002)
<i>agrII</i>	TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC	<i>Accessory gene regulator II</i>	575 pb	
<i>agrIII</i>	GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	<i>Accessory gene regulator III</i>	323 pb	
<i>agrIV</i>	CGATAATGCCGTAATACCCG	<i>Accessory gene regulator IV</i>	659 pb	
<i>pan</i>	ATGCACATGGTGCACATGC	<i>Accessory gene regulator I-IV</i>		
<i>icaA</i>	F-CTTGCTGGCGCAGTCAATAC R-CCAACATCCAACACATGGCA	<i>Intercellular adhesion A</i>	178 pb	(Pereyra, 2015)
<i>icaC</i>	F-CTTGGGTATTTGCACGCATT R-GCAATATCATGCCGACACCT	<i>Intercellular adhesion C</i>	209 pb	(Pereyra, 2015)
<i>icaD</i>	F-CGCTATATCGTGTGTCTTTTGGGA R-TCGCGAAAATGCCCATAGTT	<i>Intercellular adhesion D</i>	164 pb	(Pereyra, 2015)
<i>bap</i>	F-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC R-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	<i>Biofilm associated protein</i>	971 pb	(Cucarella y col., 2001)
<i>blaZ</i>	F-AAGAGATTTGCCTATGCTC R-GCTTGACCACTT TTATCAGC	<i>Betalactamasa</i>	520 pb	(Vesterholm Nielsen y col., 1999)

Tabla 3. Características de cepas de *S. aureus* seleccionadas para ensayos de internalización en las MAC-T.

Cepas <i>S. aureus</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>	<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	<i>blaZ</i>	Biofilm	PFGE	Procedencia clínica	Origen
3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	M	W	T-C	SF
179	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	M	B	T-SC	SF
806	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	F	D	T-SC	SF
037	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	F	H	P-SC	SF
5011	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	D	O	P-SC	SF
5128	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	F	N	P-SC	SF
V329	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	F	s/d	s/d	s/d

(T): Transitoria; (P): Persistente; (C): Clínica; (SC): Subclínica; (SF): Santa Fe, Argentina; s/d: sin datos; PFGE: pulsotipo determinado por electroforesis en gel de campo pulsado; (-): negativa para el gen; (+): positiva para el gen. (D): Débil productora de biofilm; (M): Moderada productora de biofilm; (F): Fuerte productora de biofilm.

Tabla 4. Características de cepas T y P de *S. aureus* seleccionadas para ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Cepas <i>S. aureus</i>	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>	<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	<i>blaZ</i>	Biofilm	PFGE	MSLT	UFC/ml internalizadas
806 (T)	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	F	D	ST350	5,08E+04
5011 (P)	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	D	O	CC188	2,50E+05

(T): Transitoria; (P): Persistente; PFGE: pulsotipo determinado por electroforesis en gel de campo pulsado; MSLT: tipo clonal determinado por tipificación de secuencias multilocus; UFC/ml internalizadas en las MAC-T; (D): Débil productora de biofilm; (F): Fuerte productora de biofilm.

A continuación, se adjuntan las planillas individuales con la caracterización por Genotipificación de ADN basado en microarreglos de las cepas T y P de *S. aureus* seleccionadas para los ensayos de internalización:

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.	
Operator	annett_r
Sample ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0003_071116
Experiment ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0003_071116 - {5290E3F2-1E9E-4551-B93B-AF7DE2AE5627}
Date of Result	Tue Nov 08 17:08:32 2016
AssayName	S.aureus_2.0
Assay ID	10620
Well Position	01 (01-A)
Software Version	2016_08_01
Device	04a0006
StripID	276224910620
Staining control	OK

TYPING SUMMARY

name	result
Clonal complex	CC133
Assignment score for CC identification	96.12%
Comments (regarding CC assignment)	0
Strain	CC133-MSSA (lukF-P83/lukM+)
Assignment score for strain identification	96.73%
Comments (regarding strain assignment)	0
Strain synonymes	0
Equivalent genome sequences and/or reference strains	ED133 (CP001996)
MLST sequence types associated with this strain	ST132, ST133, ST1452
Ridom spa types associated with this strain	t1403, t2678
SCC / SCCmec typing	---
Assignment score for SCC / SCCmec identification	---
Comments (regarding SCC / SCCmec typing)	---
MRSA (mecA)	negative
MRSA (mecC)	negative
PVL	negative

SPECIES MARKER

name	result	explanation
rrnD1 (S. aureus)	positive	Domain 1 of 23S-rRNA
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, locus 1
katA	positive	Katalase A
nuc1	positive	Thermostable extracellular nuclease
spa	positive	Staphylococcal protein A
sbi	positive	IgG-binding protein

REGULATORY GENES

name	result	explanation
agrI (total)	positive	Accessory gene regulator allele I
agrII (total)	negative	Accessory gene regulator allele II
agrIII (total)	negative	Accessory gene regulator allele III
agrIV (total)	negative	Accessory gene regulator allele IV
hld	positive	Haemolysin delta

METHICILLIN RESISTANCE AND SCCmec TYPING

name	result	explanation
mecA	negative	Alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
mecR	negative	Signal transducer protein MecR1
mecI	negative	Methicillin-resistance regulatory protein
mecC	negative	Alternate mec gene from SCCmec XI
blaZ (SCCmec XI)	negative	beta-lactamase from SCCmec XI
plsSCC (COL)	negative	Plasmin-sensitive surface protein
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain 1. The kdp operon is present in SCCmec II (although absent from Irish SCCmec II variants A to E).
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
fusC	negative	SCC-associated fusidic acid resistance (=Q6GD50)
ACME (total)	negative	Arginine catabolic mobile element
ccrA-1	negative	Cassette chromosome recombinase genes
ccrB-1	negative	
ccrA-2	negative	
ccrB-2	negative	
ccrA-3	negative	
ccrB-3	negative	
ccrC (85-2082)	negative	
ccrA-4	negative	
ccrB-4	negative	

HEAVY METAL RESISTANCES, SCCmec AND OTHERS

name	result	explanation
merA	negative	Mercury resistance operon
merB	negative	

RESISTANCE : PENICILLINASE

name	result	explanation
blaZ	negative	beta-lactamase
blaI	negative	beta lactamase repressor (inhibitor)
blaR	negative	beta-lactamase regulatory protein

RESISTANCE : MLS-ANTIBIOTICS

name	result	explanation
ermA	negative	rRNA adenine N-6-methyl-transferases causing erythromycin/clindamycin resistance
ermB	negative	
ermC	negative	
lnuA	negative	Lincosamid-nucleotidyltransferase A (=linA)
msrA	negative	Macrolide efflux
mefA	negative	Macrolide efflux protein A
mph(C)	negative	Probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
vat(A)	negative	Virginiamycin A acetyltransferase
vat(B)	negative	Acetyl-transferase inactivating streptogramin A
vga(A)	negative	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
vga(A) (BM 3327)	negative	
vgb	negative	Virginiamycin B hydrolase

RESISTANCE : AMINOGLYCOSIDES

name	result	explanation
aacA-aphD	negative	Bifunctional enzyme Aac/Aph; gentamicin, tobramycin resistance
aadD	negative	Aminoglycoside adenytransferase,tobramycin resistance
aphA3	negative	3_5_-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/ kanamycin resistance

RESISTANCE : MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
sat	negative	Streptothricine-acetyltransferase
dfrA	negative	Dihydrofolate reductase
far1	negative	Fusidic acid resistance (plasmid-borne)
mupA	negative	Mupirocin resistance protein
tetK	negative	Tetracycline resistance markers
tetM	negative	
cat	negative	Chloramphenicol acetyltransferase
cfr	negative	23S rRNA methyltransferase
fexA	negative	Chloramphenicol/florfenicol exporter
qacA	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein A
qacC	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein C
vanA	negative	Vancomycin resistance gene
vanB	negative	Vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
vanZ	negative	Teicoplanin resistance gene from enterococci

VIRULENCE : TOXIC SCHOCK TOXIN

name	result	explanation
tst1 (consensus)	negative	Toxic shock syndrome toxin 1
tst1 (allele from human isolates)	negative	
tst1 (allele from bovine isolates)	negative	

VIRULENCE : ENTEROTOXINS

name	result	explanation
sea	negative	Enterotoxin A
sea (320E)	negative	Enterotoxin A, allele from strain 320E
sea (N315) / sep	negative	Enterotoxin A, allele from strain N315 = enterotoxin P
seb	negative	Enterotoxin B
sec	negative	Enterotoxin C
seD2	negative	Enterotoxin D
see	negative	Enterotoxin E
seh	negative	Enterotoxin H
sej	negative	Enterotoxin J
sek	negative	Enterotoxin K
sel	negative	Enterotoxin L
seq	negative	Enterotoxin Q
ser	negative	Enterotoxin R
egc (total)	negative	egc cluster comprising seg,i,m,n,o,u
ORF CM14, probe1	negative	Enterotoxin-like protein ORF CM14
ORF CM14, probe2	negative	

VIRULENCE : HLG AND LEUKOCIDINS

name	result	explanation
lukF-PV	negative	Panton Valentine leukocidin F component
lukS-PV	negative	Panton Valentine leukocidin S component
lukF-PV (P83)	positive	S component of leukocidin from ruminant strains
lukM	positive	F component of leukocidin from ruminant strains
lukD	positive	Leukocidin D component
lukE	ambiguous	Leukocidin E component

VIRULENCE : HAEMOLYSINS

name	result	explanation
corB	positive	Putative membrane protein (=hl)
hla	positive	Haemolysin alpha
hIII (cons)	positive	Putative membrane protein
hIII (other than RF122)	negative	

h1b (total)	positive	Haemolysin beta
un-truncated h1b	positive	

VIRULENCE : HLB-CONV PHAGES

name	result	explanation
sak	negative	Staphylokinase
chp	negative	Chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal complement inhibitor

VIRULENCE : OTHER FACTORS

name	result	explanation
etA	negative	Exfoliative toxin serotype A
etB	negative	Exfoliative toxin serotype B
etD	negative	Exfoliative toxin D
edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C

VIRULENCE : PROTEASES

name	result	explanation
aur (cons)	positive	Aureolysin
splA	positive	Serin-protease A
splB	positive	Serin-protease B
splE	negative	Serin-protease E
sspA	positive	Glutamylendopeptidase
sspB	positive	Staphopain B, protease
sspP (cons)	positive	Staphopain A (Staphylopain A), protease

CAPSULE- AND BIOFILM-ASSOCIATED GENES

name	result	explanation
cap 1	negative	Capsule type 1
cap 5	negative	Capsule type 5
cap 8	positive	Capsule type 8
icaA	positive	Intercellular adhesion protein A
icaC	positive	Intercellular adhesion protein C
icaD	positive	Biofilm PIA synthesis protein D
bap	negative	Surface protein involved in biofilm formation

ADHAESION FACTORS / GENES ENCODING MICROBIAL SURFACE COMPONENTS RECOGNIZING ADHESIVE MATRIX MOLECULES (MSCRAMM GENES)

name	result	explanation
bbp (total)	positive	Bone sialoprotein-binding protein
clfA (total)	positive	Clumping factor A
clfB (total)	positive	Clumping factor B
cna	negative	Collagen-binding adhesin
ebh (cons)	positive	Cell wall associated fibronectin-binding protein
ebpS (total)	positive	Cell surface elastin binding protein
fnbA (total)	positive	Fibronectin-binding protein A
fnbB (total)	negative	Fibronectin-binding protein B
map (total)	positive	Major histocompatibility complex class II analog protein (=Extracellular adherence protein, eap)
sasG (total)	negative	Staphylococcus aureus surface protein G
sdrC (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
sdrD (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
vwb (total)	positive	van Willebrand factor binding protein

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.	
Operator	annett_r
Sample ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0037_071116
Experiment ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0037_071116 - {5E5E937E-8053-42E9-82E4-A55D8417F348}
Date of Result	Tue Nov 08 17:06:31 2016
AssayName	S.aureus_2.0
Assay ID	10620
Well Position	04 (01-D)
Software Version	2016_08_01
Device	04a0006
StripID	276224910620
Staining control	OK

TYPING SUMMARY

name	result
Clonal complex	CC97
Assignment score for CC identification	93.93%
Comments (regarding CC assignment)	0
Strain	<p><i>The strain identification failed.</i></p> <p>[CC97-MSSA-<i>ccrAB2</i>] was the most similar strain in the database, but contradictory results were observed for [<i>hp_ccrB-2_611</i>,<i>hp_ccrB-1_613</i>] suggesting the presence of a related, but distinct new strain that is not covered by the database.</p> <p>Please re-clone and repeat the experiment with a new DNA preparation and submit the array image and/or the isolate in question to Alere Technologies.</p>
Assignment score for strain identification	94.94%
Comments (regarding strain assignment)	0
Strain synonymes	0
Equivalent genome sequences and/or reference strains	Strain PB32 (ANIB)
MLST sequence types associated with this strain	0
Ridom spa types associated with this strain	0
SCC / SCCmec typing	---
Assignment score for SCC / SCCmec identification	---
Comments (regarding SCC / SCCmec typing)	---
MRSA (<i>mecA</i>)	negative
MRSA (<i>mecC</i>)	negative
PVL	negative

SPECIES MARKER

name	result	explanation
rrnD1 (S. aureus)	positive	Domain 1 of 23S-rRNA
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, locus 1

katA	positive	Katalase A
nuc1	positive	Thermostable extracellular nuclease
spa	positive	Staphylococcal protein A
sbi	positive	IgG-binding protein

REGULATORY GENES

name	result	explanation
sarA	positive	Staphylococcal accessory regulator A
saeS	positive	Histidine protein kinase, sae locus
vraS	positive	Sensor protein
agrI (total)	positive	Accessory gene regulator allele I
agrB-I	positive	
agrC-I	positive	
agrD-I	positive	
agrII (total)	negative	Accessory gene regulator allele II
agrB-II	negative	
agrC-II	negative	
agrD-II	negative	
agrIII (total)	negative	Accessory gene regulator allele III
agrB-III	negative	
agrC-III	negative	
agrD-III	negative	
agrIV (total)	negative	Accessory gene regulator allele IV
agrB-IV	negative	
agrC-IV	negative	
hld	positive	Haemolysin delta

METHICILLIN RESISTANCE AND SCCmec TYPING

name	result	explanation
ugpQ	negative	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, associated with mecA
mecA	negative	Alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
delta_mecR	negative	Truncated signal transducer protein MecR1
mecR	negative	Signal transducer protein MecR1
mecl	negative	Methicillin-resistance regulatory protein
xylR	negative	Homolog of xylose repressor, associated with SCCmec-elements (=mecR2)
mecC	negative	Alternate mec gene from SCCmec XI
blaZ (SCCmec XI)	negative	beta-lactamase from SCCmec XI
plsSCC (COL)	negative	Plasmin-sensitive surface protein
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain 1. The kdp operon is present in SCCmec II (although absent from Irish SCCmec II variants A to E).
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase, C subunit
kdpD-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, sensor histidine kinase
kdpE-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, transcriptional regulator
fusC	negative	SCC-associated fusidic acid resistance (=Q6GD50)
ACME (total)	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	Arginine deiminase
arcB-SCC	negative	Ornithine carbamoyltransferase locus 1

arcC-SCC	negative	Carbamate kinase, locus 1
arcD-SCC	negative	Arginine/ornithine antiporter
ccrA-1	positive	Cassette chromosome recombinase genes
ccrB-1	positive	
ccrA-2	negative	
ccrB-2	negative	
ccrA-3	negative	
ccrB-3	negative	
ccrAA (MRSZH47), probe 1	negative	
ccrAA (MRSZH47), probe 2	negative	
ccrC (85-2082)	negative	
ccrA-4	negative	
ccrB-4	negative	
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical protein from SCCmec elements located at the terminus of SCCmec directly next to orfX.

HEAVY METAL RESISTANCES, SCCmec AND OTHERS

name	result	explanation
merA	negative	Mercury resistance operon
merB	negative	

RESISTANCE : PENICILLINASE

name	result	explanation
blaZ	negative	beta-lactamase
blaI	negative	beta lactamase repressor (inhibitor)
blaR	negative	beta-lactamase regulatory protein

RESISTANCE : MLS-ANTIBIOTICS

name	result	explanation
ermA	negative	rRNA adenine N-6-methyl-transferases causing erythromycin/clindamycin resistance
ermB	negative	
ermC	negative	
lnuA	negative	Lincosamid-nucleotidyltransferase A (=linA)
msrA	negative	Macrolide efflux
mefA	negative	Macrolide efflux protein A
mph(C)	negative	Probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
vat(A)	negative	Virginiamycin A acetyltransferase
vat(B)	negative	Acetyl-transferase inactivating streptogramin A
vga(A)	negative	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
vga(A) (BM 3327)	negative	
vgb	negative	Virginiamycin B hydrolase

RESISTANCE : AMINOGLYCOSIDES

name	result	explanation
aacA-aphD	negative	Bifunctional enzyme Aac/Aph; gentamicin, tobramycin resistance
aadD	negative	Aminoglycoside adenytransferase,tobramycin resistance
aphA3	negative	3_5_-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/ kanamycin resistance

RESISTANCE : MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
sat	negative	Streptothricine-acetyltransferase
dfrA	negative	Dihydrofolate reductase
far1	negative	Fusidic acid resistance (plasmid-borne)
mupA	negative	Mupirocin resistance protein
tetK	negative	Tetracycline resistance markers
tetM	negative	
cat	negative	Chloramphenicol acetyltransferase
cat (pC221)	negative	
cat (pc223)	negative	
cat (pMC524)	negative	
cat (pSBK203R)	negative	
cfr	negative	23S rRNA methyltransferase
fexA	negative	Chloramphenicol/florfenicol exporter
fosB	negative	Metallothiol transferase
fosB (plasmid 1)	negative	
qacA	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein A
qacC	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein C
qacC (cons)	negative	
qacC (equine)	negative	
qacC (SA5)	negative	
qacC (S.sapr.)	negative	
qacC (ST94)	negative	
vanA	negative	Vancomycin resistance gene
vanB	negative	Vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
vanZ	negative	Teicoplanin resistance gene from enterococci

VIRULENCE : TOXIC SCHOCK TOXIN

name	result	explanation
tst1 (consensus)	negative	Toxic shock syndrome toxin 1
tst1 (allele from human isolates)	negative	
tst1 (allele from bovine isolates)	negative	

VIRULENCE : ENTEROTOXINS

name	result	explanation
sea	negative	Enterotoxin A
sea (320E)	negative	Enterotoxin A, allele from strain 320E
sea (N315) / sep	negative	Enterotoxin A, allele from strain N315 = enterotoxin P
seb	negative	Enterotoxin B
sec	negative	Enterotoxin C
sed2	negative	Enterotoxin D
see	negative	Enterotoxin E
seh	negative	Enterotoxin H
sej	negative	Enterotoxin J
sek	negative	Enterotoxin K
sel	negative	Enterotoxin L

seq	negative	Enterotoxin Q
ser	negative	Enterotoxin R
egc (total)	negative	egc cluster comprising seg,i,m,n,o,u
seg	negative	Enterotoxin G
sei	negative	Enterotoxin I
selm	negative	Enterotoxin M
seln (consensus)	negative	Enterotoxin N
seln (other than RF122)	negative	
selo	negative	Enterotoxin O
selu	negative	Enterotoxin U and/or Y
ORF CM14, probe1	negative	Enterotoxin-like protein ORF CM14
ORF CM14, probe2	negative	

VIRULENCE : HLG AND LEUKOCIDINS

name	result	explanation
lukF	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component B
lukS	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component C
lukS (ST22+ST45)	negative	
hlgA	positive	Haemolysin gamma, component A
lukF-PV	negative	Panton Valentine leukocidin F component
lukS-PV	negative	Panton Valentine leukocidin S component
lukF-PV (P83)	negative	S component of leukocidin from ruminant strains
lukM	negative	F component of leukocidin from ruminant strains
lukD	positive	Leukocidin D component
lukE	positive	Leukocidin E component
lukX	positive	Leukocidin/ haemolysin toxin family protein
lukY	positive	Leukocidin/haemolysin toxin family protein
lukY (ST30+ST45)	negative	

VIRULENCE : HAEMOLYSINS

name	result	explanation
corB	positive	Putative membrane protein (=hl)
hla	positive	Haemolysin alpha
hlIII (cons)	positive	Putative membrane protein
hlIII (other than RF122)	positive	
hlb (total)	positive	Haemolysin beta
hlb-probe 1	positive	
hlb-probe 2	positive	
hlb-probe 3	negative	
un-truncated hlb	positive	

VIRULENCE : HLB-CONV PHAGES

name	result	explanation
sak	negative	Staphylokinase
chp	negative	Chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal complement inhibitor

VIRULENCE : OTHER FACTORS

name	result	explanation
etA	negative	Exfoliative toxin serotype A
etB	negative	Exfoliative toxin serotype B
etD	negative	Exfoliative toxin D
edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C

VIRULENCE : PROTEASES

name	result	explanation
aur (cons)	positive	Aureolysin
aur (Other than MRSA252)	positive	
aur (MRSA252)	negative	
spIA	positive	Serin-protease A
spIB	positive	Serin-protease B
spIE	positive	Serin-protease E
sspA	positive	Glutamylendopeptidase
sspB	positive	Staphopain B, protease
sspP (cons)	positive	Staphopain A (Staphylopain A), protease
sspP (other than ST93)	positive	

VIRULENCE : STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN/ENTEROTOXIN-LIKE GENES (SET/SSL)

name	result	explanation
selX	positive	Staphyl. exotoxin-like protein (=setC)
set6-var1_11	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 1
set6-var2_11	negative	
set6-var1_12	negative	
set6-var2_12	negative	
set6-var4_11	negative	
ssl01-RF122	positive	
ssl01/set6 (COL)	negative	
ssl01/set6 (Mu50+N315)	negative	
ssl01/set6 (MW2+MSSA476)	negative	
ssl01/set6 (MRSA252)	negative	
ssl01/set6 (RF122)	positive	
ssl01/set6 (other alleles)	negative	
ssl02/set7	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 2
ssl02/set7 (MRSA252)	negative	
ssl03/set8, probe 1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 3
ssl03/set8, probe 2	negative	
ssl03/set8 (MRSA252, SAR0424)	negative	
ssl04/set9	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 4
ssl04/set9 (MRSA252, SAR0425)	negative	
ssl05/set3, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 5
ssl05/set3 (RF122, probe-611)	positive	
ssl05/set3, probe 2 (612)	ambiguous	

ssl05/set3 (MRSA252)	negative	
ssl06/set21	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 6
ssl06 (NCTC8325+MW2)	negative	
ssl07/set1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 7
ssl07/set1 (MRSA252)	negative	
ssl07/set1 (AF188836)	negative	
ssl08/set12, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 8
ssl08/set12, probe 2	positive	
ssl09/set5, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 9
ssl09/set5, probe 2	positive	
ssl09/set5 (MRSA252)	negative	
ssl10/set4	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 10
ssl10 (RF122)	negative	
ssl10/set4 (MRSA252)	negative	
ssl11/set2 (COL)	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 11
ssl11+set2(Mu50+N315)	negative	
ssl11+set2(MW2+MSSA476)	negative	
ssl11/set2 (MRSA252)	negative	
setB3	positive	Staphylococcal exotoxin-like protein, second locus
setB3 (MRSA252)	negative	
setB2	positive	
setB2 (MRSA252)	negative	
setB1	positive	

CAPSULE- AND BIOFILM-ASSOCIATED GENES

name	result	explanation
cap 1	negative	Capsule type 1
capH1	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ1	negative	O-antigen polymerase
capK1	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 5	positive	Capsule type 5
capH5	positive	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ5	positive	O-antigen polymerase
capK5	positive	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 8	negative	Capsule type 8
capH8	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capI8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
capJ8	negative	O-antigen polymerase
capK8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
icaA	positive	Intercellular adhesion protein A
icaC	positive	Intercellular adhesion protein C
icaD	positive	Biofilm PIA synthesis protein D
bap	negative	Surface protein involved in biofilm formation

IMMUNODOMINANT ANTIGEN B

name	result	explanation
isaB	positive	Immunodominant antigen B
isaB (MRSA252)	ambiguous	

DEFENSIN RESISTANCE

name	result	explanation
mprF (COL+MW2)	positive	Defensin resistance protein
mprF (Mu50+252)	negative	

TRANSFERRIN BINDING PROTEIN

name	result	explanation
isdA (cons)	positive	Transferrin-binding protein
isdA (MRSA252)	negative	
isdA (Other Than MRSA252)	positive	

PUTATIVE TRANSPORTER

name	result	explanation
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (RF122)	negative	
ImrP (RF122)	negative	

TYPE I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM, SINGLE SEQUENCE SPECIFICITY PROTEIN

name	result	explanation
hsdS1 (RF122)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 1st locus
hsdS2 (ST5+ST8)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 2nd locus
hsdS2 (MW2+476)	negative	
hsdS2 (RF122)	negative	
hsdS2 (MRSA252)	negative	
hsdS3 (Other Than RF122+252)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 3rd locus
hsdS3 (ST8+ST1+RF122)	negative	
hsdS3 (Mu50+N315)	negative	
hsdS3 (CC51+252)	negative	
hsdS3 (MRSA252)	negative	
hsdSx (CC25)	positive	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, unknown locus
hsdSx (CC15)	negative	
hsdSx (etd)	negative	

MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
ear2	negative	Putative protein (= Q2FXC0)
Q2YUB3	positive	Multidrug resistance transporter
Q7A4X2	positive	Putative protein
sdrM	positive	Multidrug efflux protein (= tetEfflux)

HYALURONATE LYASE

name	result	explanation
hysA1 (MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, different alleles

hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (cons)	positive	
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (COL+USA300)	negative	
hysA2 (All Other Than MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, second locus
hysA2 (COL+USA300+NCTC)	negative	
hysA2 (All Other Than COL+USA300+NCTC)	positive	
hysA2-AllOther Than COL+USA300+NCTC	positive	
hysA2 (MRSA252)	negative	

ADHAESION FACTORS / GENES ENCODING MICROBIAL SURFACE COMPONENTS RECOGNIZING ADHESIVE MATRIX MOLECULES (MSCRAMM GENES)

name	result	explanation
bbp (total)	negative	Bone sialoprotein-binding protein
bbp (cons)	negative	
bbp (COL+MW2)	negative	
bbp (MRSA252)	negative	
bbp (Mu50)	negative	
bbp (RF122)	negative	
bbp (ST45)	negative	
clfA (total)	positive	Clumping factor A
clfA (cons)	positive	
clfA (COL+RF122)	positive	
clfA (MRSA252)	negative	
clfA (Mu50+MW2)	ambiguous	
clfB (total)	positive	Clumping factor B
clfB (cons)	positive	
clfB (COL+Mu50)	negative	
clfB (MW2)	negative	
clfB (RF122)	negative	
cna	negative	Collagen-binding adhesin
ebh (cons)	positive	Cell wall associated fibronectin-binding protein
ebpS (total)	positive	Cell surface elastin binding protein
ebpS, probe 2	positive	
ebpS, probe 1	positive	
ebpS (01-1111)	negative	
ebpS (COL)	negative	
eno	positive	Enolase
efb / fib	positive	Fibrinogen binding protein (19 kDa)
efb / fib (MRSA252)	negative	
fnbA (total)	positive	Fibronectin-binding protein A
fnbA (cons)	positive	
fnbA (COL)	negative	
fnbA (MRSA252)	negative	
fnbA (Mu50+MW2)	negative	
fnbA (RF122)	negative	
fnbB (total)	negative	Fibronectin-binding protein B
fnbB (COL)	negative	

fnbB (COL+Mu50+MW2)	positive	
fnbB (Mu50)	ambiguous	
fnbB (MW2)	negative	
fnbB (ST15)	negative	
fnbB (ST45-2)	negative	
map (total)	positive	Major histocompatibility complex class II analog protein (=Extracellular adherence protein, eap)
map (COL)	positive	
map (MRSA252)	negative	
map (Mu50+MW2)	positive	
sasG (total)	positive	Staphylococcus aureus surface protein G
sasG (COL+Mu50)	positive	
sasG (MW2)	negative	
sasG (Other Than 252+122)	positive	
sdrC (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
sdrC (cons)	positive	
sdrC (B1)	negative	
sdrC (COL)	negative	
sdrC (Mu50)	positive	
sdrC (MW2+MRSA252+RF122)	negative	
sdrC (Other Than 252+RF122)	positive	
sdrD (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
sdrD (cons)	positive	
sdrD (COL+MW2)	negative	
sdrD (Mu50)	positive	
sdrD (other)	negative	
vwb (total)	positive	van Willebrand factor binding protein
vwb (cons)	positive	
vwb (COL+MW2)	negative	
vwb (MRSA252)	negative	
vwb (Mu50)	negative	
vwb (RF122)	positive	

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.	
Operator	annett_r
Sample ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0179_071116
Experiment ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0179_071116 - {086DAADE-79A0-4076-973D-D88E4B8D241B}
Date of Result	Tue Nov 08 17:05:17 2016
AssayName	S.aureus_2.0
Assay ID	10620
Well Position	06 (01-F)
Software Version	2016_08_01
Device	04a0006
StripID	276224910620
Staining control	OK

TYPING SUMMARY

name	result
Clonal complex	Capsule deficient CC97
Assignment score for CC identification	88.59%
Comments (regarding CC assignment)	Rare and/or poorly characterised lineage - please submit array image.
Strain	CC97/ST746-MSSA (Capsule negative)
Assignment score for strain identification	95.09%
Comments (regarding strain assignment)	Rare and/or poorly characterised strain - please submit array image.
Strain synonymes	0
Equivalent genome sequences and/or reference strains	0
MLST sequence types associated with this strain	ST746
Ridom spa types associated with this strain	0
SCC / SCCmec typing	---
Assignment score for SCC / SCCmec identification	---
Comments (regarding SCC / SCCmec typing)	---
MRSA (mecA)	negative
MRSA (mecC)	negative
PVL	negative

SPECIES MARKER

name	result	explanation
rrnD1 (S. aureus)	positive	Domain 1 of 23S-rRNA
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, locus 1
katA	positive	Katalase A
nuc1	positive	Thermostable extracellular nuclease
spa	positive	Staphylococcal protein A
sbi	positive	IgG-binding protein

REGULATORY GENES

name	result	explanation
sarA	positive	Staphylococcal accessory regulator A
saeS	positive	Histidine protein kinase, sae locus
vraS	positive	Sensor protein
agrI (total)	positive	Accessory gene regulator allele I
agrB-I	positive	
agrC-I	positive	
agrD-I	positive	
agrII (total)	negative	Accessory gene regulator allele II
agrB-II	negative	
agrC-II	negative	
agrD-II	negative	
agrIII (total)	negative	Accessory gene regulator allele III
agrB-III	negative	
agrC-III	negative	
agrD-III	negative	
agrIV (total)	ambiguous	Accessory gene regulator allele IV
agrB-IV	positive	
agrC-IV	negative	
hld	positive	Haemolysin delta

METHICILLIN RESISTANCE AND SCCmec TYPING

name	result	explanation
ugpQ	negative	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, associated with mecA
mecA	negative	Alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
delta_mecR	negative	Truncated signal transducer protein MecR1
mecR	negative	Signal transducer protein MecR1
mecl	negative	Methicillin-resistance regulatory protein
xylR	negative	Homolog of xylose repressor, associated with SCCmec-elements (=mecR2)
mecC	negative	Alternate mec gene from SCCmec XI
blaZ (SCCmec XI)	negative	beta-lactamase from SCCmec XI
plsSCC (COL)	negative	Plasmin-sensitive surface protein
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain 1. The kdp operon is present in SCCmec II (although absent from Irish SCCmec II variants A to E).
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase, C subunit
kdpD-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, sensor histidine kinase
kdpE-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, transcriptional regulator
fusC	negative	SCC-associated fusidic acid resistance (=Q6GD50)
ACME (total)	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	Arginine deiminase
arcB-SCC	negative	Ornithine carbamoyltransferase locus 1
arcC-SCC	negative	Carbamate kinase, locus 1
arcD-SCC	negative	Arginine/ornithine antiporter
ccrA-1	negative	Cassette chromosome recombinase genes
ccrB-1	negative	
ccrA-2	negative	
ccrB-2	negative	

ccrA-3	negative	
ccrB-3	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 1	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 2	negative	
ccrC (85-2082)	negative	
ccrA-4	negative	
ccrB-4	negative	
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical protein from SCCmec elements located at the terminus of SCCmec directly next to orfX.

HEAVY METAL RESISTANCES, SCCmec AND OTHERS

name	result	explanation
merA	negative	Mercury resistance operon
merB	negative	

RESISTANCE : PENICILLINASE

name	result	explanation
blaZ	negative	beta-lactamase
blal	negative	beta lactamase repressor (inhibitor)
blaR	negative	beta-lactamase regulatory protein

RESISTANCE : MLS-ANTIBIOTICS

name	result	explanation
ermA	negative	rRNA adenine N-6-methyl-transferases causing erythromycin/clindamycin resistance
ermB	negative	
ermC	negative	
lnuA	negative	Lincosamid-nucleotidyltransferase A (=linA)
msrA	negative	Macrolide efflux
mefA	negative	Macrolide efflux protein A
mph(C)	negative	Probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
vat(A)	negative	Virginiamycin A acetyltransferase
vat(B)	negative	Acetyl-transferase inactivating streptogramin A
vga(A)	negative	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
vga(A) (BM 3327)	negative	
vgb	negative	Virginiamycin B hydrolase

RESISTANCE : AMINOGLYCOSIDES

name	result	explanation
aacA-aphD	negative	Bifunctional enzyme Aac/Aph; gentamicin, tobramycin resistance
aadD	negative	Aminoglycoside adenytransferase,tobramycin resistance
aphA3	negative	3_5_-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/ kanamycin resistance

RESISTANCE : MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
sat	negative	Streptothricine-acetyltransferase
dfrA	negative	Dihydrofolate reductase
far1	negative	Fusidic acid resistance (plasmid-borne)

mupA	negative	Mupirocin resistance protein
tetK	negative	Tetracycline resistance markers
tetM	negative	
cat	negative	Chloramphenicol acetyltransferase
cat (pC221)	negative	
cat (pc223)	negative	
cat (pMC524)	negative	
cat (pSBK203R)	negative	
cfr	negative	23S rRNA methyltransferase
fexA	negative	Chloramphenicol/florfenicol exporter
fosB	negative	Metallothiol transferase
fosB (plasmid 1)	negative	
qacA	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein A
qacC	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein C
qacC (cons)	negative	
qacC (equine)	negative	
qacC (SA5)	negative	
qacC (S.sapr.)	negative	
qacC (ST94)	negative	
vanA	negative	Vancomycin resistance gene
vanB	negative	Vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
vanZ	negative	Teicoplanin resistance gene from enterococci

VIRULENCE : TOXIC SCHOCK TOXIN

name	result	explanation
tst1 (consensus)	negative	Toxic shock syndrome toxin 1
tst1 (allele from human isolates)	negative	
tst1 (allele from bovine isolates)	negative	

VIRULENCE : ENTEROTOXINS

name	result	explanation
sea	negative	Enterotoxin A
sea (320E)	negative	Enterotoxin A, allele from strain 320E
sea (N315) / sep	negative	Enterotoxin A, allele from strain N315 = enterotoxin P
seb	negative	Enterotoxin B
sec	negative	Enterotoxin C
seD2	negative	Enterotoxin D
see	negative	Enterotoxin E
seh	negative	Enterotoxin H
sej	negative	Enterotoxin J
sek	negative	Enterotoxin K
sel	negative	Enterotoxin L
seq	negative	Enterotoxin Q
ser	negative	Enterotoxin R
egc (total)	negative	egc cluster comprising seg,i,m,n,o,u
seg	negative	Enterotoxin G
sei	negative	Enterotoxin I

selm	negative	Enterotoxin M
seln (consensus)	negative	Enterotoxin N
seln (other than RF122)	negative	
selo	negative	Enterotoxin O
selu	negative	Enterotoxin U and/or Y
ORF CM14, probe1	negative	Enterotoxin-like protein ORF CM14
ORF CM14, probe2	negative	

VIRULENCE : HLG AND LEUKOCIDINS

name	result	explanation
lukF	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component B
lukS	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component C
lukS (ST22+ST45)	positive	
hlgA	positive	Haemolysin gamma, component A
lukF-PV	negative	Panton Valentine leukocidin F component
lukS-PV	negative	Panton Valentine leukocidin S component
lukF-PV (P83)	negative	S component of leukocidin from ruminant strains
lukM	negative	F component of leukocidin from ruminant strains
lukD	positive	Leukocidin D component
lukE	positive	Leukocidin E component
lukX	positive	Leukocidin/ haemolysin toxin family protein
lukY	positive	Leukocidin/haemolysin toxin family protein
lukY (ST30+ST45)	negative	

VIRULENCE : HAEMOLYSINS

name	result	explanation
corB	positive	Putative membrane protein (=hl)
hla	positive	Haemolysin alpha
hlIII (cons)	positive	Putative membrane protein
hlIII (other than RF122)	positive	
hIb (total)	positive	Haemolysin beta
hIb-probe 1	positive	
hIb-probe 2	positive	
hIb-probe 3	positive	
un-truncated hIb	positive	

VIRULENCE : HLB-CONV PHAGES

name	result	explanation
sak	negative	Staphylokinase
chp	negative	Chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal complement inhibitor

VIRULENCE : OTHER FACTORS

name	result	explanation
etA	negative	Exfoliative toxin serotype A
etB	negative	Exfoliative toxin serotype B
etD	negative	Exfoliative toxin D

edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C

VIRULENCE : PROTEASES

name	result	explanation
aur (cons)	positive	Aureolysin
aur (Other than MRSA252)	positive	
aur (MRSA252)	negative	
spIA	positive	Serin-protease A
spIB	positive	Serin-protease B
spIE	positive	Serin-protease E
sspA	positive	Glutamylendopeptidase
sspB	positive	Staphopain B, protease
sspP (cons)	positive	Staphopain A (Staphylopain A), protease
sspP (other than ST93)	positive	

VIRULENCE : STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN/ENTEROTOXIN-LIKE GENES (SET/SSL)

name	result	explanation
selX	positive	Staphyl. exotoxin-like protein (=setC)
set6-var1_11	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 1
set6-var2_11	ambiguous	
set6-var1_12	positive	
set6-var2_12	negative	
set6-var4_11	positive	
ssl01-RF122	negative	
ssl01/set6 (COL)	negative	
ssl01/set6 (Mu50+N315)	positive	
ssl01/set6 (MW2+MSSA476)	negative	
ssl01/set6 (MRSA252)	negative	
ssl01/set6 (RF122)	negative	
ssl01/set6 (other alleles)	negative	
ssl02/set7	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 2
ssl02/set7 (MRSA252)	negative	
ssl03/set8, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 3
ssl03/set8, probe 2	positive	
ssl03/set8 (MRSA252, SAR0424)	negative	
ssl04/set9	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 4
ssl04/set9 (MRSA252, SAR0425)	negative	
ssl05/set3, probe 1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 5
ssl05/set3 (RF122, probe-611)	positive	
ssl05/set3, probe 2 (612)	ambiguous	
ssl05/set3 (MRSA252)	negative	
ssl06/set21	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 6
ssl06 (NCTC8325+MW2)	negative	
ssl07/set1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 7
ssl07/set1 (MRSA252)	ambiguous	

ssl07/set1 (AF188836)	negative	
ssl08/set12, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 8
ssl08/set12, probe 2	positive	
ssl09/set5, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 9
ssl09/set5, probe 2	positive	
ssl09/set5 (MRSA252)	negative	
ssl10/set4	ambiguous	Staphylococcal superantigen-like protein 10
ssl10 (RF122)	positive	
ssl10/set4 (MRSA252)	negative	
ssl11/set2 (COL)	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 11
ssl11+set2(Mu50+N315)	negative	
ssl11+set2(MW2+MSSA476)	negative	
ssl11/set2 (MRSA252)	negative	
setB3	positive	Staphylococcal exotoxin-like protein, second locus
setB3 (MRSA252)	negative	
setB2	positive	
setB2 (MRSA252)	negative	
setB1	positive	

CAPSULE- AND BIOFILM-ASSOCIATED GENES

name	result	explanation
cap 1	negative	Capsule type 1
capH1	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ1	negative	O-antigen polymerase
capK1	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 5	negative	Capsule type 5
capH5	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ5	negative	O-antigen polymerase
capK5	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 8	negative	Capsule type 8
capH8	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capI8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
capJ8	negative	O-antigen polymerase
capK8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
icaA	positive	Intercellular adhesion protein A
icaC	positive	Intercellular adhesion protein C
icaD	positive	Biofilm PIA synthesis protein D
bap	negative	Surface protein involved in biofilm formation

IMMUNODOMINANT ANTIGEN B

name	result	explanation
isaB	ambiguous	Immunodominant antigen B
isaB (MRSA252)	positive	

DEFENSIN RESISTANCE

name	result	explanation
mprF (COL+MW2)	positive	Defensin resistance protein

mprF (Mu50+252)

ambiguous

TRANSFERRIN BINDING PROTEIN

name	result	explanation
isdA (cons)	positive	Transferrin-binding protein
isdA (MRSA252)	ambiguous	
isdA (Other Than MRSA252)	positive	

PUTATIVE TRANSPORTER

name	result	explanation
ImrP (Other Than RF122)	negative	
ImrP (Other Than RF122)	negative	
ImrP (RF122)	positive	
ImrP (RF122)	positive	

TYPE I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM, SINGLE SEQUENCE SPECIFICITY PROTEIN

name	result	explanation
hsdS1 (RF122)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 1st locus
hsdS2 (ST5+ST8)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 2nd locus
hsdS2 (MW2+476)	negative	
hsdS2 (RF122)	negative	
hsdS2 (MRSA252)	negative	
hsdS3 (Other Than RF122+252)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 3rd locus
hsdS3 (ST8+ST1+RF122)	negative	
hsdS3 (Mu50+N315)	negative	
hsdS3 (CC51+252)	negative	
hsdS3 (MRSA252)	negative	
hsdSx (CC25)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, unknown locus
hsdSx (CC15)	positive	
hsdSx (etd)	negative	

MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
ear2	negative	Putative protein (= Q2FXC0)
Q2YUB3	positive	Multidrug resistance transporter
Q7A4X2	positive	Putative protein
sdrM	positive	Multidrug efflux protein (= tetEfflux)

HYALURONATE LYASE

name	result	explanation
hysA1 (MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, different alleles
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (cons)	positive	
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (COL+USA300)	negative	
hysA2 (All Other Than MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, second locus
hysA2 (COL+USA300+NCTC)	negative	

hysA2 (All Other Than COL+USA300+NCTC)	positive	
hysA2-AllOther Than COL+USA300+NCTC	positive	
hysA2 (MRSA252)	negative	

ADHAESION FACTORS / GENES ENCODING MICROBIAL SURFACE COMPONENTS RECOGNIZING ADHESIVE MATRIX MOLECULES (MSCRAMM GENES)

name	result	explanation
bbp (total)	positive	Bone sialoprotein-binding protein
bbp (cons)	positive	
bbp (COL+MW2)	negative	
bbp (MRSA252)	negative	
bbp (Mu50)	positive	
bbp (RF122)	negative	
bbp (ST45)	negative	
clfA (total)	positive	Clumping factor A
clfA (cons)	positive	
clfA (COL+RF122)	positive	
clfA (MRSA252)	ambiguous	
clfA (Mu50+MW2)	ambiguous	
clfB (total)	positive	Clumping factor B
clfB (cons)	positive	
clfB (COL+Mu50)	negative	
clfB (MW2)	negative	
clfB (RF122)	positive	
cna	negative	Collagen-binding adhesin
ebh (cons)	positive	Cell wall associated fibronectin-binding protein
ebpS (total)	positive	Cell surface elastin binding protein
ebpS, probe 2	positive	
ebpS, probe 1	positive	
ebpS (01-1111)	negative	
ebpS (COL)	negative	
eno	positive	Enolase
efb / fib	positive	Fibrinogen binding protein (19 kDa)
efb / fib (MRSA252)	negative	
fnbA (total)	positive	Fibronectin-binding protein A
fnbA (cons)	positive	
fnbA (COL)	negative	
fnbA (MRSA252)	negative	
fnbA (Mu50+MW2)	negative	
fnbA (RF122)	negative	
fnbB (total)	negative	Fibronectin-binding protein B
fnbB (COL)	negative	
fnbB (COL+Mu50+MW2)	ambiguous	
fnbB (Mu50)	positive	
fnbB (MW2)	negative	
fnbB (ST15)	negative	
fnbB (ST45-2)	negative	

map (total)	positive	Major histocompatibility complex class II analog protein (=Extracellular adherence protein, eap)
map (COL)	positive	
map (MRSA252)	negative	
map (Mu50+MW2)	positive	
sasG (total)	positive	Staphylococcus aureus surface protein G
sasG (COL+Mu50)	positive	
sasG (MW2)	negative	
sasG (Other Than 252+122)	positive	
sdrC (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
sdrC (cons)	positive	
sdrC (B1)	negative	
sdrC (COL)	negative	
sdrC (Mu50)	positive	
sdrC (MW2+MRSA252+RF122)	positive	
sdrC (Other Than 252+RF122)	positive	
sdrD (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
sdrD (cons)	positive	
sdrD (COL+MW2)	negative	
sdrD (Mu50)	positive	
sdrD (other)	negative	
vwb (total)	positive	van Willebrand factor binding protein
vwb (cons)	positive	
vwb (COL+MW2)	negative	
vwb (MRSA252)	negative	
vwb (Mu50)	negative	
vwb (RF122)	positive	

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Operator	annett_r
Sample ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0908_071116
Experiment ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-0908_071116 - {3E83B86F-5104-47D3-B103-40BCCB6A1E86}
Date of Result	Tue Nov 08 17:00:30 2016
AssayName	S.aureus_2.0
Assay ID	10620
Well Position	09 (02-A)
Software Version	2016_08_01
Device	04a0006
StripID	276225010620
Staining control	OK

TYPING SUMMARY

name	result
Clonal complex	ST350
Assignment score for CC identification	95.63%
Comments (regarding CC assignment)	0
Strain	ST350-MSSA
Assignment score for strain identification	96.73%
Comments (regarding strain assignment)	0
Strain synonymes	0
Equivalent genome sequences and/or reference strains	0
MLST sequence types associated with this strain	ST350, ST (6-79-397-47-7-70-61)
Ridom spa types associated with this strain	t1106
SCC / SCCmec typing	---
Assignment score for SCC / SCCmec identification	---
Comments (regarding SCC / SCCmec typing)	---
MRSA (mecA)	negative
MRSA (mecC)	negative
PVL	negative

SPECIES MARKER

name	result	explanation
rrnD1 (S. aureus)	positive	Domain 1 of 23S-rRNA
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, locus 1
katA	positive	Katalase A
nuc1	positive	Thermostable extracellular nuclease
spa	positive	Staphylococcal protein A
sbi	positive	IgG-binding protein

REGULATORY GENES

name	result	explanation
sarA	positive	Staphylococcal accessory regulator A
saeS	positive	Histidine protein kinase, sae locus
vraS	positive	Sensor protein
agrI (total)	negative	Accessory gene regulator allele I
agrB-I	negative	
agrC-I	negative	
agrD-I	negative	
agrII (total)	positive	Accessory gene regulator allele II
agrB-II	positive	
agrC-II	positive	
agrD-II	positive	
agrIII (total)	negative	Accessory gene regulator allele III
agrB-III	negative	
agrC-III	negative	
agrD-III	negative	
agrIV (total)	negative	Accessory gene regulator allele IV
agrB-IV	negative	
agrC-IV	negative	
hld	positive	Haemolysin delta

METHICILLIN RESISTANCE AND SCCmec TYPING

name	result	explanation
ugpQ	negative	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, associated with mecA
mecA	negative	Alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
delta_mecR	negative	Truncated signal transducer protein MecR1
mecR	negative	Signal transducer protein MecR1
mecl	negative	Methicillin-resistance regulatory protein
xylR	negative	Homolog of xylose repressor, associated with SCCmec-elements (=mecR2)
mecC	negative	Alternate mec gene from SCCmec XI
blaZ (SCCmec XI)	negative	beta-lactamase from SCCmec XI
plsSCC (COL)	negative	Plasmin-sensitive surface protein
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain 1. The kdp operon is present in SCCmec II (although absent from Irish SCCmec II variants A to E).
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase, C subunit
kdpD-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, sensor histidine kinase
kdpE-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, transcriptional regulator
fusC	negative	SCC-associated fusidic acid resistance (=Q6GD50)
ACME (total)	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	Arginine deiminase
arcB-SCC	negative	Ornithine carbamoyltransferase locus 1
arcC-SCC	negative	Carbamate kinase, locus 1
arcD-SCC	negative	Arginine/ornithine antiporter
ccrA-1	negative	Cassette chromosome recombinase genes
ccrB-1	negative	
ccrA-2	negative	
ccrB-2	negative	

ccrA-3	negative	
ccrB-3	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 1	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 2	negative	
ccrC (85-2082)	negative	
ccrA-4	negative	
ccrB-4	negative	
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical protein from SCCmec elements located at the terminus of SCCmec directly next to orfX.

HEAVY METAL RESISTANCES, SCCmec AND OTHERS

name	result	explanation
merA	negative	Mercury resistance operon
merB	negative	

RESISTANCE : PENICILLINASE

name	result	explanation
blaZ	negative	beta-lactamase
blal	negative	beta lactamase repressor (inhibitor)
blaR	negative	beta-lactamase regulatory protein

RESISTANCE : MLS-ANTIBIOTICS

name	result	explanation
ermA	negative	rRNA adenine N-6-methyl-transferases causing erythromycin/clindamycin resistance
ermB	negative	
ermC	negative	
lnuA	negative	Lincosamid-nucleotidyltransferase A (=linA)
msrA	negative	Macrolide efflux
mefA	negative	Macrolide efflux protein A
mph(C)	negative	Probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
vat(A)	negative	Virginiamycin A acetyltransferase
vat(B)	negative	Acetyl-transferase inactivating streptogramin A
vga(A)	negative	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
vga(A) (BM 3327)	negative	
vgb	negative	Virginiamycin B hydrolase

RESISTANCE : AMINOGLYCOSIDES

name	result	explanation
aacA-aphD	negative	Bifunctional enzyme Aac/Aph; gentamicin, tobramycin resistance
aadD	negative	Aminoglycoside adenytransferase, tobramycin resistance
aphA3	negative	3_5_-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/kanamycin resistance

RESISTANCE : MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
sat	negative	Streptothricine-acetyltransferase
dfrA	negative	Dihydrofolate reductase
far1	negative	Fusidic acid resistance (plasmid-borne)

mupA	negative	Mupirocin resistance protein
tetK	negative	Tetracycline resistance markers
tetM	negative	
cat	negative	Chloramphenicol acetyltransferase
cat (pC221)	negative	
cat (pc223)	negative	
cat (pMC524)	negative	
cat (pSBK203R)	negative	
cfr	negative	23S rRNA methyltransferase
fexA	negative	Chloramphenicol/lorfenicol exporter
fosB	negative	Metallothiol transferase
fosB (plasmid 1)	negative	
qacA	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein A
qacC	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein C
qacC (cons)	negative	
qacC (equine)	negative	
qacC (SA5)	negative	
qacC (S.sapr.)	negative	
qacC (ST94)	negative	
vanA	negative	Vancomycin resistance gene
vanB	negative	Vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
vanZ	negative	Teicoplanin resistance gene from enterococci

VIRULENCE : TOXIC SCHOCK TOXIN

name	result	explanation
tst1 (consensus)	negative	Toxic shock syndrome toxin 1
tst1 (allele from human isolates)	negative	
tst1 (allele from bovine isolates)	negative	

VIRULENCE : ENTEROTOXINS

name	result	explanation
sea	negative	Enterotoxin A
sea (320E)	negative	Enterotoxin A, allele from strain 320E
sea (N315) / sep	negative	Enterotoxin A, allele from strain N315 = enterotoxin P
seb	negative	Enterotoxin B
sec	negative	Enterotoxin C
seD2	negative	Enterotoxin D
see	negative	Enterotoxin E
seh	negative	Enterotoxin H
sej	negative	Enterotoxin J
sek	negative	Enterotoxin K
sel	negative	Enterotoxin L
seq	negative	Enterotoxin Q
ser	negative	Enterotoxin R
egc (total)	positive	egc cluster comprising seg,i,m,n,o,u
seg	negative	Enterotoxin G
sei	positive	Enterotoxin I

selm	positive	Enterotoxin M
seln (consensus)	positive	Enterotoxin N
seln (other than RF122)	positive	
selo	positive	Enterotoxin O
selu	positive	Enterotoxin U and/or Y
ORF CM14, probe1	negative	Enterotoxin-like protein ORF CM14
ORF CM14, probe2	negative	

VIRULENCE : HLG AND LEUKOCIDINS

name	result	explanation
lukF	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component B
lukS	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component C
lukS (ST22+ST45)	negative	
hlgA	positive	Haemolysin gamma, component A
lukF-PV	negative	Panton Valentine leukocidin F component
lukS-PV	negative	Panton Valentine leukocidin S component
lukF-PV (P83)	negative	S component of leukocidin from ruminant strains
lukM	negative	F component of leukocidin from ruminant strains
lukD	positive	Leukocidin D component
lukE	positive	Leukocidin E component
lukX	positive	Leukocidin/ haemolysin toxin family protein
lukY	positive	Leukocidin/haemolysin toxin family protein
lukY (ST30+ST45)	negative	

VIRULENCE : HAEMOLYSINS

name	result	explanation
corB	positive	Putative membrane protein (=hl)
hla	positive	Haemolysin alpha
hlIII (cons)	positive	Putative membrane protein
hlIII (other than RF122)	negative	
hIb (total)	positive	Haemolysin beta
hIb-probe 1	positive	
hIb-probe 2	positive	
hIb-probe 3	positive	
un-truncated hIb	positive	

VIRULENCE : HLB-CONV PHAGES

name	result	explanation
sak	negative	Staphylokinase
chp	negative	Chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal complement inhibitor

VIRULENCE : OTHER FACTORS

name	result	explanation
etA	negative	Exfoliative toxin serotype A
etB	negative	Exfoliative toxin serotype B
etD	negative	Exfoliative toxin D

edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C

VIRULENCE : PROTEASES

name	result	explanation
aur (cons)	positive	Aureolysin
aur (Other than MRSA252)	positive	
aur (MRSA252)	negative	
spIA	negative	Serin-protease A
spIB	negative	Serin-protease B
spIE	positive	Serin-protease E
sspA	positive	Glutamylendopeptidase
sspB	positive	Staphopain B, protease
sspP (cons)	positive	Staphopain A (Staphylopain A), protease
sspP (other than ST93)	positive	

VIRULENCE : STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN/ENTEROTOXIN-LIKE GENES (SET/SSL)

name	result	explanation
selX	positive	Staphyl. exotoxin-like protein (=setC)
set6-var1_11	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 1
set6-var2_11	positive	
set6-var1_12	positive	
set6-var2_12	negative	
set6-var4_11	positive	
ssl01-RF122	negative	
ssl01/set6 (COL)	negative	
ssl01/set6 (Mu50+N315)	negative	
ssl01/set6 (MW2+MSSA476)	negative	
ssl01/set6 (MRSA252)	positive	
ssl01/set6 (RF122)	negative	
ssl01/set6 (other alleles)	negative	
ssl02/set7	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 2
ssl02/set7 (MRSA252)	negative	
ssl03/set8, probe 1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 3
ssl03/set8, probe 2	negative	
ssl03/set8 (MRSA252, SAR0424)	negative	
ssl04/set9	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 4
ssl04/set9 (MRSA252, SAR0425)	negative	
ssl05/set3, probe 1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 5
ssl05/set3 (RF122, probe-611)	positive	
ssl05/set3, probe 2 (612)	ambiguous	
ssl05/set3 (MRSA252)	negative	
ssl06/set21	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 6
ssl06 (NCTC8325+MW2)	negative	
ssl07/set1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 7
ssl07/set1 (MRSA252)	positive	

ssl07/set1 (AF188836)	negative	
ssl08/set12, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 8
ssl08/set12, probe 2	positive	
ssl09/set5, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 9
ssl09/set5, probe 2	positive	
ssl09/set5 (MRSA252)	negative	
ssl10/set4	ambiguous	Staphylococcal superantigen-like protein 10
ssl10 (RF122)	positive	
ssl10/set4 (MRSA252)	negative	
ssl11/set2 (COL)	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 11
ssl11+set2(Mu50+N315)	negative	
ssl11+set2(MW2+MSSA476)	negative	
ssl11/set2 (MRSA252)	negative	
setB3	negative	Staphylococcal exotoxin-like protein, second locus
setB3 (MRSA252)	negative	
setB2	positive	
setB2 (MRSA252)	negative	
setB1	positive	

CAPSULE- AND BIOFILM-ASSOCIATED GENES

name	result	explanation
cap 1	negative	Capsule type 1
capH1	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ1	negative	O-antigen polymerase
capK1	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 5	positive	Capsule type 5
capH5	positive	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ5	positive	O-antigen polymerase
capK5	positive	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 8	negative	Capsule type 8
capH8	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capI8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
capJ8	negative	O-antigen polymerase
capK8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
icaA	positive	Intercellular adhesion protein A
icaC	positive	Intercellular adhesion protein C
icaD	positive	Biofilm PIA synthesis protein D
bap	negative	Surface protein involved in biofilm formation

IMMUNODOMINANT ANTIGEN B

name	result	explanation
isaB	ambiguous	Immunodominant antigen B
isaB (MRSA252)	positive	

DEFENSIN RESISTANCE

name	result	explanation
mprF (COL+MW2)	positive	Defensin resistance protein

mprF (Mu50+252)

ambiguous

TRANSFERRIN BINDING PROTEIN

name	result	explanation
isdA (cons)	positive	Transferrin-binding protein
isdA (MRSA252)	negative	
isdA (Other Than MRSA252)	positive	

PUTATIVE TRANSPORTER

name	result	explanation
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (RF122)	negative	
ImrP (RF122)	negative	

TYPE I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM, SINGLE SEQUENCE SPECIFICITY PROTEIN

name	result	explanation
hsdS1 (RF122)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 1st locus
hsdS2 (ST5+ST8)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 2nd locus
hsdS2 (MW2+476)	negative	
hsdS2 (RF122)	negative	
hsdS2 (MRSA252)	negative	
hsdS3 (Other Than RF122+252)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 3rd locus
hsdS3 (ST8+ST1+RF122)	positive	
hsdS3 (Mu50+N315)	negative	
hsdS3 (CC51+252)	negative	
hsdS3 (MRSA252)	negative	
hsdSx (CC25)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, unknown locus
hsdSx (CC15)	negative	
hsdSx (etd)	negative	

MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
ear2	negative	Putative protein (= Q2FXC0)
Q2YUB3	positive	Multidrug resistance transporter
Q7A4X2	negative	Putative protein
sdrM	positive	Multidrug efflux protein (= tetEfflux)

HYALURONATE LYASE

name	result	explanation
hysA1 (MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, different alleles
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (cons)	positive	
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (COL+USA300)	negative	
hysA2 (All Other Than MRSA252)	ambiguous	Hyaluronate lyase, second locus
hysA2 (COL+USA300+NCTC)	negative	

hysA2 (All Other Than COL+USA300+NCTC)	positive	
hysA2-AllOther Than COL+USA300+NCTC	positive	
hysA2 (MRSA252)	negative	

ADHAESION FACTORS / GENES ENCODING MICROBIAL SURFACE COMPONENTS RECOGNIZING ADHESIVE MATRIX MOLECULES (MSCRAMM GENES)

name	result	explanation
bbp (total)	negative	Bone sialoprotein-binding protein
bbp (cons)	negative	
bbp (COL+MW2)	negative	
bbp (MRSA252)	negative	
bbp (Mu50)	negative	
bbp (RF122)	negative	
bbp (ST45)	negative	
clfA (total)	positive	Clumping factor A
clfA (cons)	positive	
clfA (COL+RF122)	negative	
clfA (MRSA252)	negative	
clfA (Mu50+MW2)	positive	
clfB (total)	positive	Clumping factor B
clfB (cons)	positive	
clfB (COL+Mu50)	negative	
clfB (MW2)	negative	
clfB (RF122)	negative	
cna	positive	Collagen-binding adhesin
ebh (cons)	positive	Cell wall associated fibronectin-binding protein
ebpS (total)	positive	Cell surface elastin binding protein
ebpS, probe 2	positive	
ebpS, probe 1	positive	
ebpS (01-1111)	negative	
ebpS (COL)	negative	
eno	positive	Enolase
efb / fib	positive	Fibrinogen binding protein (19 kDa)
efb / fib (MRSA252)	negative	
fnbA (total)	positive	Fibronectin-binding protein A
fnbA (cons)	positive	
fnbA (COL)	positive	
fnbA (MRSA252)	negative	
fnbA (Mu50+MW2)	negative	
fnbA (RF122)	negative	
fnbB (total)	negative	Fibronectin-binding protein B
fnbB (COL)	negative	
fnbB (COL+Mu50+MW2)	negative	
fnbB (Mu50)	negative	
fnbB (MW2)	negative	
fnbB (ST15)	negative	
fnbB (ST45-2)	negative	

map (total)	positive	Major histocompatibility complex class II analog protein (=Extracellular adherence protein, eap)
map (COL)	positive	
map (MRSA252)	negative	
map (Mu50+MW2)	negative	
sasG (total)	negative	Staphylococcus aureus surface protein G
sasG (COL+Mu50)	negative	
sasG (MW2)	negative	
sasG (Other Than 252+122)	negative	
sdrC (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
sdrC (cons)	positive	
sdrC (B1)	negative	
sdrC (COL)	negative	
sdrC (Mu50)	positive	
sdrC (MW2+MRSA252+RF122)	negative	
sdrC (Other Than 252+RF122)	negative	
sdrD (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
sdrD (cons)	positive	
sdrD (COL+MW2)	negative	
sdrD (Mu50)	negative	
sdrD (other)	negative	
vwb (total)	positive	van Willebrand factor binding protein
vwb (cons)	positive	
vwb (COL+MW2)	positive	
vwb (MRSA252)	negative	
vwb (Mu50)	negative	
vwb (RF122)	negative	

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Operator	annett_r
Sample ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-5011_071116
Experiment ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-5011_071116 - {B19747E9-9B41-41B5-AE3C-1F6F0D168D51}
Date of Result	Tue Nov 08 17:01:44 2016
AssayName	S.aureus_2.0
Assay ID	10620
Well Position	11 (02-C)
Software Version	2016_08_01
Device	04a0006
StripID	276225010620
Staining control	OK

TYPING SUMMARY

name	result
Clonal complex	CC188
Assignment score for CC identification	96.12%
Comments (regarding CC assignment)	0
Strain	CC188-MSSA
Assignment score for strain identification	96.28%
Comments (regarding strain assignment)	0
Strain synonymes	0
Equivalent genome sequences and/or reference strains	Strain M0239 (AIWE)
MLST sequence types associated with this strain	ST188
Ridom spa types associated with this strain	t189,t3380
SCC / SCCmec typing	---
Assignment score for SCC / SCCmec identification	---
Comments (regarding SCC / SCCmec typing)	---
MRSA (mecA)	negative
MRSA (mecC)	negative
PVL	negative

SPECIES MARKER

name	result	explanation
rrnD1 (S. aureus)	positive	Domain 1 of 23S-rRNA
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, locus 1
katA	positive	Katalase A
nuc1	positive	Thermostable extracellular nuclease
spa	positive	Staphylococcal protein A
sbi	positive	IgG-binding protein

REGULATORY GENES

name	result	explanation
sarA	positive	Staphylococcal accessory regulator A
saeS	positive	Histidine protein kinase, sae locus
vraS	positive	Sensor protein
agrI (total)	positive	Accessory gene regulator allele I
agrB-I	positive	
agrC-I	positive	
agrD-I	positive	
agrII (total)	negative	Accessory gene regulator allele II
agrB-II	negative	
agrC-II	negative	
agrD-II	negative	
agrIII (total)	negative	Accessory gene regulator allele III
agrB-III	negative	
agrC-III	negative	
agrD-III	negative	
agrIV (total)	ambiguous	Accessory gene regulator allele IV
agrB-IV	positive	
agrC-IV	negative	
hld	positive	Haemolysin delta

METHICILLIN RESISTANCE AND SCCmec TYPING

name	result	explanation
ugpQ	negative	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, associated with mecA
mecA	negative	Alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
delta_mecR	negative	Truncated signal transducer protein MecR1
mecR	negative	Signal transducer protein MecR1
mecl	negative	Methicillin-resistance regulatory protein
xylR	negative	Homolog of xylose repressor, associated with SCCmec-elements (=mecR2)
mecC	negative	Alternate mec gene from SCCmec XI
blaZ (SCCmec XI)	negative	beta-lactamase from SCCmec XI
plsSCC (COL)	negative	Plasmin-sensitive surface protein
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain 1. The kdp operon is present in SCCmec II (although absent from Irish SCCmec II variants A to E).
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase, C subunit
kdpD-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, sensor histidine kinase
kdpE-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, transcriptional regulator
fusC	negative	SCC-associated fusidic acid resistance (=Q6GD50)
ACME (total)	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	Arginine deiminase
arcB-SCC	negative	Ornithine carbamoyltransferase locus 1
arcC-SCC	negative	Carbamate kinase, locus 1
arcD-SCC	negative	Arginine/ornithine antiporter
ccrA-1	negative	Cassette chromosome recombinase genes
ccrB-1	negative	
ccrA-2	negative	
ccrB-2	negative	

ccrA-3	negative	
ccrB-3	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 1	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 2	negative	
ccrC (85-2082)	negative	
ccrA-4	negative	
ccrB-4	negative	
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical protein from SCCmec elements located at the terminus of SCCmec directly next to orfX.

HEAVY METAL RESISTANCES, SCCmec AND OTHERS

name	result	explanation
merA	negative	Mercury resistance operon
merB	negative	

RESISTANCE : PENICILLINASE

name	result	explanation
blaZ	positive	beta-lactamase
blal	positive	beta lactamase repressor (inhibitor)
blaR	positive	beta-lactamase regulatory protein

RESISTANCE : MLS-ANTIBIOTICS

name	result	explanation
ermA	negative	rRNA adenine N-6-methyl-transferases causing erythromycin/clindamycin resistance
ermB	negative	
ermC	negative	
lnuA	negative	Lincosamid-nucleotidyltransferase A (=linA)
msrA	negative	Macrolide efflux
mefA	negative	Macrolide efflux protein A
mph(C)	negative	Probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
vat(A)	negative	Virginiamycin A acetyltransferase
vat(B)	negative	Acetyl-transferase inactivating streptogramin A
vga(A)	negative	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
vga(A) (BM 3327)	negative	
vgb	negative	Virginiamycin B hydrolase

RESISTANCE : AMINOGLYCOSIDES

name	result	explanation
aacA-aphD	negative	Bifunctional enzyme Aac/Aph; gentamicin, tobramycin resistance
aadD	negative	Aminoglycoside adenytransferase, tobramycin resistance
aphA3	negative	3_5_-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/kanamycin resistance

RESISTANCE : MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
sat	negative	Streptothricine-acetyltransferase
dfrA	negative	Dihydrofolate reductase
far1	negative	Fusidic acid resistance (plasmid-borne)

mupA	negative	Mupirocin resistance protein
tetK	negative	Tetracycline resistance markers
tetM	negative	
cat	negative	Chloramphenicol acetyltransferase
cat (pC221)	negative	
cat (pc223)	negative	
cat (pMC524)	negative	
cat (pSBK203R)	negative	
cfr	negative	23S rRNA methyltransferase
fexA	negative	Chloramphenicol/lorfenicol exporter
fosB	negative	Metallothiol transferase
fosB (plasmid 1)	negative	
qacA	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein A
qacC	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein C
qacC (cons)	negative	
qacC (equine)	negative	
qacC (SA5)	negative	
qacC (S.sapr.)	negative	
qacC (ST94)	negative	
vanA	negative	Vancomycin resistance gene
vanB	negative	Vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
vanZ	negative	Teicoplanin resistance gene from enterococci

VIRULENCE : TOXIC SCHOCK TOXIN

name	result	explanation
tst1 (consensus)	negative	Toxic shock syndrome toxin 1
tst1 (allele from human isolates)	negative	
tst1 (allele from bovine isolates)	negative	

VIRULENCE : ENTEROTOXINS

name	result	explanation
sea	negative	Enterotoxin A
sea (320E)	negative	Enterotoxin A, allele from strain 320E
sea (N315) / sep	negative	Enterotoxin A, allele from strain N315 = enterotoxin P
seb	positive	Enterotoxin B
sec	negative	Enterotoxin C
seD2	negative	Enterotoxin D
see	negative	Enterotoxin E
seh	negative	Enterotoxin H
sej	negative	Enterotoxin J
sek	negative	Enterotoxin K
sel	negative	Enterotoxin L
seq	negative	Enterotoxin Q
ser	negative	Enterotoxin R
egc (total)	negative	egc cluster comprising seg,i,m,n,o,u
seg	negative	Enterotoxin G
sei	negative	Enterotoxin I

selm	negative	Enterotoxin M
seln (consensus)	negative	Enterotoxin N
seln (other than RF122)	negative	
selo	negative	Enterotoxin O
selu	negative	Enterotoxin U and/or Y
ORF CM14, probe1	negative	Enterotoxin-like protein ORF CM14
ORF CM14, probe2	negative	

VIRULENCE : HLG AND LEUKOCIDINS

name	result	explanation
lukF	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component B
lukS	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component C
lukS (ST22+ST45)	positive	
hlgA	positive	Haemolysin gamma, component A
lukF-PV	negative	Panton Valentine leukocidin F component
lukS-PV	negative	Panton Valentine leukocidin S component
lukF-PV (P83)	negative	S component of leukocidin from ruminant strains
lukM	negative	F component of leukocidin from ruminant strains
lukD	positive	Leukocidin D component
lukE	positive	Leukocidin E component
lukX	positive	Leukocidin/ haemolysin toxin family protein
lukY	positive	Leukocidin/haemolysin toxin family protein
lukY (ST30+ST45)	negative	

VIRULENCE : HAEMOLYSINS

name	result	explanation
corB	positive	Putative membrane protein (=hl)
hla	positive	Haemolysin alpha
hlIII (cons)	positive	Putative membrane protein
hlIII (other than RF122)	positive	
hIb (total)	positive	Haemolysin beta
hIb-probe 1	positive	
hIb-probe 2	positive	
hIb-probe 3	positive	
un-truncated hIb	ambiguous	

VIRULENCE : HLB-CONV PHAGES

name	result	explanation
sak	positive	Staphylokinase
chp	positive	Chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
scn	positive	Staphylococcal complement inhibitor

VIRULENCE : OTHER FACTORS

name	result	explanation
etA	negative	Exfoliative toxin serotype A
etB	negative	Exfoliative toxin serotype B
etD	negative	Exfoliative toxin D

edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C

VIRULENCE : PROTEASES

name	result	explanation
aur (cons)	positive	Aureolysin
aur (Other than MRSA252)	positive	
aur (MRSA252)	negative	
spIA	positive	Serin-protease A
spIB	positive	Serin-protease B
spIE	positive	Serin-protease E
sspA	positive	Glutamylendopeptidase
sspB	positive	Staphopain B, protease
sspP (cons)	positive	Staphopain A (Staphylopain A), protease
sspP (other than ST93)	positive	

VIRULENCE : STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN/ENTEROTOXIN-LIKE GENES (SET/SSL)

name	result	explanation
selX	positive	Staphyl. exotoxin-like protein (=setC)
set6-var1_11	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 1
set6-var2_11	positive	
set6-var1_12	negative	
set6-var2_12	positive	
set6-var4_11	negative	
ssl01-RF122	negative	
ssl01/set6 (COL)	negative	
ssl01/set6 (Mu50+N315)	negative	
ssl01/set6 (MW2+MSSA476)	positive	
ssl01/set6 (MRSA252)	negative	
ssl01/set6 (RF122)	negative	
ssl01/set6 (other alleles)	negative	
ssl02/set7	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 2
ssl02/set7 (MRSA252)	negative	
ssl03/set8, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 3
ssl03/set8, probe 2	positive	
ssl03/set8 (MRSA252, SAR0424)	negative	
ssl04/set9	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 4
ssl04/set9 (MRSA252, SAR0425)	negative	
ssl05/set3, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 5
ssl05/set3 (RF122, probe-611)	ambiguous	
ssl05/set3, probe 2 (612)	positive	
ssl05/set3 (MRSA252)	negative	
ssl06/set21	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 6
ssl06 (NCTC8325+MW2)	positive	
ssl07/set1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 7
ssl07/set1 (MRSA252)	ambiguous	

ssl07/set1 (AF188836)	negative	
ssl08/set12, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 8
ssl08/set12, probe 2	positive	
ssl09/set5, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 9
ssl09/set5, probe 2	positive	
ssl09/set5 (MRSA252)	negative	
ssl10/set4	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 10
ssl10 (RF122)	negative	
ssl10/set4 (MRSA252)	ambiguous	
ssl11/set2 (COL)	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 11
ssl11+set2(Mu50+N315)	negative	
ssl11+set2(MW2+MSSA476)	positive	
ssl11/set2 (MRSA252)	negative	
setB3	positive	Staphylococcal exotoxin-like protein, second locus
setB3 (MRSA252)	negative	
setB2	positive	
setB2 (MRSA252)	negative	
setB1	positive	

CAPSULE- AND BIOFILM-ASSOCIATED GENES

name	result	explanation
cap 1	negative	Capsule type 1
capH1	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ1	negative	O-antigen polymerase
capK1	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 5	negative	Capsule type 5
capH5	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ5	negative	O-antigen polymerase
capK5	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 8	positive	Capsule type 8
capH8	positive	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capI8	positive	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
capJ8	positive	O-antigen polymerase
capK8	positive	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
icaA	positive	Intercellular adhesion protein A
icaC	positive	Intercellular adhesion protein C
icaD	positive	Biofilm PIA synthesis protein D
bap	negative	Surface protein involved in biofilm formation

IMMUNODOMINANT ANTIGEN B

name	result	explanation
isaB	ambiguous	Immunodominant antigen B
isaB (MRSA252)	positive	

DEFENSIN RESISTANCE

name	result	explanation
mprF (COL+MW2)	positive	Defensin resistance protein

mprF (Mu50+252)

ambiguous

TRANSFERRIN BINDING PROTEIN

name	result	explanation
isdA (cons)	positive	Transferrin-binding protein
isdA (MRSA252)	ambiguous	
isdA (Other Than MRSA252)	positive	

PUTATIVE TRANSPORTER

name	result	explanation
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (RF122)	negative	
ImrP (RF122)	negative	

TYPE I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM, SINGLE SEQUENCE SPECIFICITY PROTEIN

name	result	explanation
hsdS1 (RF122)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 1st locus
hsdS2 (ST5+ST8)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 2nd locus
hsdS2 (MW2+476)	positive	
hsdS2 (RF122)	negative	
hsdS2 (MRSA252)	negative	
hsdS3 (Other Than RF122+252)	positive	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 3rd locus
hsdS3 (ST8+ST1+RF122)	negative	
hsdS3 (Mu50+N315)	negative	
hsdS3 (CC51+252)	positive	
hsdS3 (MRSA252)	negative	
hsdSx (CC25)	positive	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, unknown locus
hsdSx (CC15)	positive	
hsdSx (etd)	negative	

MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
ear2	negative	Putative protein (= Q2FXC0)
Q2YUB3	negative	Multidrug resistance transporter
Q7A4X2	negative	Putative protein
sdrM	positive	Multidrug efflux protein (= tetEfflux)

HYALURONATE LYASE

name	result	explanation
hysA1 (MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, different alleles
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (cons)	positive	
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (COL+USA300)	negative	
hysA2 (All Other Than MRSA252)	positive	Hyaluronate lyase, second locus
hysA2 (COL+USA300+NCTC)	negative	

hysA2 (All Other Than COL+USA300+NCTC)	positive	
hysA2-AllOther Than COL+USA300+NCTC	positive	
hysA2 (MRSA252)	negative	

ADHAESION FACTORS / GENES ENCODING MICROBIAL SURFACE COMPONENTS RECOGNIZING ADHESIVE MATRIX MOLECULES (MSCRAMM GENES)

name	result	explanation
bbp (total)	positive	Bone sialoprotein-binding protein
bbp (cons)	positive	
bbp (COL+MW2)	positive	
bbp (MRSA252)	negative	
bbp (Mu50)	ambiguous	
bbp (RF122)	negative	
bbp (ST45)	negative	
clfA (total)	positive	Clumping factor A
clfA (cons)	positive	
clfA (COL+RF122)	negative	
clfA (MRSA252)	negative	
clfA (Mu50+MW2)	positive	
clfB (total)	positive	Clumping factor B
clfB (cons)	positive	
clfB (COL+Mu50)	negative	
clfB (MW2)	negative	
clfB (RF122)	positive	
cna	positive	Collagen-binding adhesin
ebh (cons)	positive	Cell wall associated fibronectin-binding protein
ebpS (total)	positive	Cell surface elastin binding protein
ebpS, probe 2	positive	
ebpS, probe 1	positive	
ebpS (01-1111)	negative	
ebpS (COL)	positive	
eno	positive	Enolase
efb / fib	positive	Fibrinogen binding protein (19 kDa)
efb / fib (MRSA252)	negative	
fnbA (total)	positive	Fibronectin-binding protein A
fnbA (cons)	positive	
fnbA (COL)	negative	
fnbA (MRSA252)	negative	
fnbA (Mu50+MW2)	negative	
fnbA (RF122)	negative	
fnbB (total)	negative	Fibronectin-binding protein B
fnbB (COL)	negative	
fnbB (COL+Mu50+MW2)	ambiguous	
fnbB (Mu50)	positive	
fnbB (MW2)	negative	
fnbB (ST15)	ambiguous	
fnbB (ST45-2)	negative	

map (total)	positive	Major histocompatibility complex class II analog protein (=Extracellular adherence protein, eap)
map (COL)	positive	
map (MRSA252)	negative	
map (Mu50+MW2)	positive	
sasG (total)	negative	Staphylococcus aureus surface protein G
sasG (COL+Mu50)	negative	
sasG (MW2)	negative	
sasG (Other Than 252+122)	negative	
sdrC (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
sdrC (cons)	positive	
sdrC (B1)	negative	
sdrC (COL)	positive	
sdrC (Mu50)	negative	
sdrC (MW2+MRSA252+RF122)	negative	
sdrC (Other Than 252+RF122)	negative	
sdrD (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
sdrD (cons)	positive	
sdrD (COL+MW2)	negative	
sdrD (Mu50)	positive	
sdrD (other)	negative	
vwb (total)	positive	van Willebrand factor binding protein
vwb (cons)	positive	
vwb (COL+MW2)	negative	
vwb (MRSA252)	positive	
vwb (Mu50)	negative	
vwb (RF122)	negative	

For Research Use Only. Not For Use In Diagnostic Procedures.

Operator	annett_r
Sample ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-8215_071116
Experiment ID	Staph-Bio-DNA_SantaFe-8215_071116 - {6C3EA52A-3FD7-4647-A3B2-B668C41EFBE8}
Date of Result	Tue Nov 08 17:02:20 2016
AssayName	S.aureus_2.0
Assay ID	10620
Well Position	12 (02-D)
Software Version	2016_08_01
Device	04a0006
StripID	276225010620
Staining control	OK

TYPING SUMMARY

name	result
Clonal complex	CC97
Assignment score for CC identification	93.69%
Comments (regarding CC assignment)	0
Strain	CC97-MSSA
Assignment score for strain identification	94.64%
Comments (regarding strain assignment)	0
Strain synonymes	0
Equivalent genome sequences and/or reference strains	ATCC6538, ATCC 29740, Newbould 305 ((AKYW))
MLST sequence types associated with this strain	ST97, ST115, ST464
Ridom spa types associated with this strain	t044, t131, t224, t267, t359, t521,t524, t528, t693, t1234
SCC / SCCmec typing	---
Assignment score for SCC / SCCmec identification	---
Comments (regarding SCC / SCCmec typing)	---
MRSA (mecA)	negative
MRSA (mecC)	negative
PVL	negative

SPECIES MARKER

name	result	explanation
rrnD1 (S. aureus)	positive	Domain 1 of 23S-rRNA
gapA	positive	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, locus 1
katA	positive	Katalase A
nuc1	positive	Thermostable extracellular nuclease
spa	positive	Staphylococcal protein A
sbi	positive	IgG-binding protein

REGULATORY GENES

name	result	explanation
sarA	positive	Staphylococcal accessory regulator A
saeS	positive	Histidine protein kinase, sae locus
vraS	positive	Sensor protein
agrI (total)	positive	Accessory gene regulator allele I
agrB-I	positive	
agrC-I	positive	
agrD-I	positive	
agrII (total)	negative	Accessory gene regulator allele II
agrB-II	negative	
agrC-II	negative	
agrD-II	negative	
agrIII (total)	negative	Accessory gene regulator allele III
agrB-III	negative	
agrC-III	negative	
agrD-III	negative	
agrIV (total)	ambiguous	Accessory gene regulator allele IV
agrB-IV	positive	
agrC-IV	negative	
hld	positive	Haemolysin delta

METHICILLIN RESISTANCE AND SCCmec TYPING

name	result	explanation
ugpQ	negative	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, associated with mecA
mecA	negative	Alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
delta_mecR	negative	Truncated signal transducer protein MecR1
mecR	negative	Signal transducer protein MecR1
mecl	negative	Methicillin-resistance regulatory protein
xylR	negative	Homolog of xylose repressor, associated with SCCmec-elements (=mecR2)
mecC	negative	Alternate mec gene from SCCmec XI
blaZ (SCCmec XI)	negative	beta-lactamase from SCCmec XI
plsSCC (COL)	negative	Plasmin-sensitive surface protein
kdpA-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase A chain 1. The kdp operon is present in SCCmec II (although absent from Irish SCCmec II variants A to E).
kdpB-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase B chain
kdpC-SCC	negative	Potassium-transporting ATPase, C subunit
kdpD-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, sensor histidine kinase
kdpE-SCC	negative	Two component sensor/regulator of kdp operon, transcriptional regulator
fusC	negative	SCC-associated fusidic acid resistance (=Q6GD50)
ACME (total)	negative	Arginine catabolic mobile element
arcA-SCC	negative	Arginine deiminase
arcB-SCC	negative	Ornithine carbamoyltransferase locus 1
arcC-SCC	negative	Carbamate kinase, locus 1
arcD-SCC	negative	Arginine/ornithine antiporter
ccrA-1	negative	Cassette chromosome recombinase genes
ccrB-1	negative	
ccrA-2	negative	
ccrB-2	negative	

ccrA-3	negative	
ccrB-3	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 1	negative	
ccrAA (MRSZ47), probe 2	negative	
ccrC (85-2082)	negative	
ccrA-4	negative	
ccrB-4	negative	
Q9XB68-dcs	negative	Hypothetical protein from SCCmec elements located at the terminus of SCCmec directly next to orfX.

HEAVY METAL RESISTANCES, SCCmec AND OTHERS

name	result	explanation
merA	negative	Mercury resistance operon
merB	negative	

RESISTANCE : PENICILLINASE

name	result	explanation
blaZ	negative	beta-lactamase
blal	negative	beta lactamase repressor (inhibitor)
blaR	negative	beta-lactamase regulatory protein

RESISTANCE : MLS-ANTIBIOTICS

name	result	explanation
ermA	negative	rRNA adenine N-6-methyl-transferases causing erythromycin/clindamycin resistance
ermB	negative	
ermC	negative	
lnuA	negative	Lincosamid-nucleotidyltransferase A (=linA)
msrA	negative	Macrolide efflux
mefA	negative	Macrolide efflux protein A
mph(C)	negative	Probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
vat(A)	negative	Virginiamycin A acetyltransferase
vat(B)	negative	Acetyl-transferase inactivating streptogramin A
vga(A)	negative	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
vga(A) (BM 3327)	negative	
vgb	negative	Virginiamycin B hydrolase

RESISTANCE : AMINOGLYCOSIDES

name	result	explanation
aacA-aphD	negative	Bifunctional enzyme Aac/Aph; gentamicin, tobramycin resistance
aadD	negative	Aminoglycoside adenytransferase, tobramycin resistance
aphA3	negative	3_5_-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/kanamycin resistance

RESISTANCE : MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
sat	negative	Streptothricine-acetyltransferase
dfrA	negative	Dihydrofolate reductase
far1	negative	Fusidic acid resistance (plasmid-borne)

mupA	negative	Mupirocin resistance protein
tetK	negative	Tetracycline resistance markers
tetM	negative	
cat	negative	Chloramphenicol acetyltransferase
cat (pC221)	negative	
cat (pc223)	negative	
cat (pMC524)	negative	
cat (pSBK203R)	negative	
cfr	negative	23S rRNA methyltransferase
fexA	negative	Chloramphenicol/lorfenicol exporter
fosB	negative	Metallothiol transferase
fosB (plasmid 1)	negative	
qacA	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein A
qacC	negative	Quaternary ammonium compound resistance protein C
qacC (cons)	negative	
qacC (equine)	negative	
qacC (SA5)	negative	
qacC (S.sapr.)	negative	
qacC (ST94)	negative	
vanA	negative	Vancomycin resistance gene
vanB	negative	Vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
vanZ	negative	Teicoplanin resistance gene from enterococci

VIRULENCE : TOXIC SCHOCK TOXIN

name	result	explanation
tst1 (consensus)	negative	Toxic shock syndrome toxin 1
tst1 (allele from human isolates)	negative	
tst1 (allele from bovine isolates)	negative	

VIRULENCE : ENTEROTOXINS

name	result	explanation
sea	negative	Enterotoxin A
sea (320E)	negative	Enterotoxin A, allele from strain 320E
sea (N315) / sep	negative	Enterotoxin A, allele from strain N315 = enterotoxin P
seb	negative	Enterotoxin B
sec	negative	Enterotoxin C
seD2	negative	Enterotoxin D
see	negative	Enterotoxin E
seh	negative	Enterotoxin H
sej	negative	Enterotoxin J
sek	negative	Enterotoxin K
sel	negative	Enterotoxin L
seq	negative	Enterotoxin Q
ser	negative	Enterotoxin R
egc (total)	negative	egc cluster comprising seg,i,m,n,o,u
seg	negative	Enterotoxin G
sei	negative	Enterotoxin I

selm	negative	Enterotoxin M
seln (consensus)	negative	Enterotoxin N
seln (other than RF122)	negative	
selo	negative	Enterotoxin O
selu	negative	Enterotoxin U and/or Y
ORF CM14, probe1	negative	Enterotoxin-like protein ORF CM14
ORF CM14, probe2	negative	

VIRULENCE : HLG AND LEUKOCIDINS

name	result	explanation
lukF	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component B
lukS	positive	Haemolysin gamma / leukocidin, component C
lukS (ST22+ST45)	positive	
hlgA	positive	Haemolysin gamma, component A
lukF-PV	negative	Panton Valentine leukocidin F component
lukS-PV	negative	Panton Valentine leukocidin S component
lukF-PV (P83)	negative	S component of leukocidin from ruminant strains
lukM	negative	F component of leukocidin from ruminant strains
lukD	positive	Leukocidin D component
lukE	positive	Leukocidin E component
lukX	positive	Leukocidin/ haemolysin toxin family protein
lukY	positive	Leukocidin/haemolysin toxin family protein
lukY (ST30+ST45)	negative	

VIRULENCE : HAEMOLYSINS

name	result	explanation
corB	positive	Putative membrane protein (=hl)
hla	positive	Haemolysin alpha
hlIII (cons)	positive	Putative membrane protein
hlIII (other than RF122)	positive	
hIb (total)	positive	Haemolysin beta
hIb-probe 1	positive	
hIb-probe 2	positive	
hIb-probe 3	positive	
un-truncated hIb	positive	

VIRULENCE : HLB-CONV PHAGES

name	result	explanation
sak	negative	Staphylokinase
chp	negative	Chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
scn	negative	Staphylococcal complement inhibitor

VIRULENCE : OTHER FACTORS

name	result	explanation
etA	negative	Exfoliative toxin serotype A
etB	negative	Exfoliative toxin serotype B
etD	negative	Exfoliative toxin D

edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C

VIRULENCE : PROTEASES

name	result	explanation
aur (cons)	positive	Aureolysin
aur (Other than MRSA252)	positive	
aur (MRSA252)	negative	
spIA	positive	Serin-protease A
spIB	positive	Serin-protease B
spIE	positive	Serin-protease E
sspA	positive	Glutamylendopeptidase
sspB	positive	Staphopain B, protease
sspP (cons)	positive	Staphopain A (Staphylopain A), protease
sspP (other than ST93)	positive	

VIRULENCE : STAPHYLOCOCCAL SUPERANTIGEN/ENTEROTOXIN-LIKE GENES (SET/SSL)

name	result	explanation
selX	positive	Staphyl. exotoxin-like protein (=setC)
set6-var1_11	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 1
set6-var2_11	negative	
set6-var1_12	negative	
set6-var2_12	negative	
set6-var4_11	negative	
ssl01-RF122	positive	
ssl01/set6 (COL)	negative	
ssl01/set6 (Mu50+N315)	negative	
ssl01/set6 (MW2+MSSA476)	negative	
ssl01/set6 (MRSA252)	negative	
ssl01/set6 (RF122)	positive	
ssl01/set6 (other alleles)	negative	
ssl02/set7	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 2
ssl02/set7 (MRSA252)	negative	
ssl03/set8, probe 1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 3
ssl03/set8, probe 2	negative	
ssl03/set8 (MRSA252, SAR0424)	negative	
ssl04/set9	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 4
ssl04/set9 (MRSA252, SAR0425)	negative	
ssl05/set3, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 5
ssl05/set3 (RF122, probe-611)	positive	
ssl05/set3, probe 2 (612)	ambiguous	
ssl05/set3 (MRSA252)	negative	
ssl06/set21	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 6
ssl06 (NCTC8325+MW2)	negative	
ssl07/set1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 7
ssl07/set1 (MRSA252)	ambiguous	

ssl07/set1 (AF188836)	negative	
ssl08/set12, probe 1	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 8
ssl08/set12, probe 2	positive	
ssl09/set5, probe 1	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 9
ssl09/set5, probe 2	negative	
ssl09/set5 (MRSA252)	negative	
ssl10/set4	positive	Staphylococcal superantigen-like protein 10
ssl10 (RF122)	negative	
ssl10/set4 (MRSA252)	ambiguous	
ssl11/set2 (COL)	negative	Staphylococcal superantigen-like protein 11
ssl11+set2(Mu50+N315)	negative	
ssl11+set2(MW2+MSSA476)	negative	
ssl11/set2 (MRSA252)	negative	
setB3	positive	Staphylococcal exotoxin-like protein, second locus
setB3 (MRSA252)	negative	
setB2	positive	
setB2 (MRSA252)	negative	
setB1	positive	

CAPSULE- AND BIOFILM-ASSOCIATED GENES

name	result	explanation
cap 1	negative	Capsule type 1
capH1	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ1	negative	O-antigen polymerase
capK1	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 5	positive	Capsule type 5
capH5	positive	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capJ5	positive	O-antigen polymerase
capK5	positive	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
cap 8	negative	Capsule type 8
capH8	negative	Capsular polysaccharide synthesis enzyme
capI8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
capJ8	negative	O-antigen polymerase
capK8	negative	Capsular polysaccharide biosynthesis protein
icaA	positive	Intercellular adhesion protein A
icaC	positive	Intercellular adhesion protein C
icaD	positive	Biofilm PIA synthesis protein D
bap	negative	Surface protein involved in biofilm formation

IMMUNODOMINANT ANTIGEN B

name	result	explanation
isaB	ambiguous	Immunodominant antigen B
isaB (MRSA252)	positive	

DEFENSIN RESISTANCE

name	result	explanation
mprF (COL+MW2)	positive	Defensin resistance protein

mprF (Mu50+252)

ambiguous

TRANSFERRIN BINDING PROTEIN

name	result	explanation
isdA (cons)	positive	Transferrin-binding protein
isdA (MRSA252)	negative	
isdA (Other Than MRSA252)	positive	

PUTATIVE TRANSPORTER

name	result	explanation
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (Other Than RF122)	positive	
ImrP (RF122)	negative	
ImrP (RF122)	negative	

TYPE I RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEM, SINGLE SEQUENCE SPECIFICITY PROTEIN

name	result	explanation
hsdS1 (RF122)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 1st locus
hsdS2 (ST5+ST8)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 2nd locus
hsdS2 (MW2+476)	negative	
hsdS2 (RF122)	negative	
hsdS2 (MRSA252)	negative	
hsdS3 (Other Than RF122+252)	negative	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, 3rd locus
hsdS3 (ST8+ST1+RF122)	negative	
hsdS3 (Mu50+N315)	negative	
hsdS3 (CC51+252)	negative	
hsdS3 (MRSA252)	negative	
hsdSx (CC25)	positive	Type I site-specific deoxyribonuclease subunit, unknown locus
hsdSx (CC15)	negative	
hsdSx (etd)	negative	

MISCELLANEOUS GENES

name	result	explanation
ear2	negative	Putative protein (= Q2FXC0)
Q2YUB3	positive	Multidrug resistance transporter
Q7A4X2	positive	Putative protein
sdrM	positive	Multidrug efflux protein (= tetEfflux)

HYALURONATE LYASE

name	result	explanation
hysA1 (MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, different alleles
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (cons)	positive	
hysA1 (MRSA252+RF122) and/or hysA2 (COL+USA300)	negative	
hysA2 (All Other Than MRSA252)	negative	Hyaluronate lyase, second locus
hysA2 (COL+USA300+NCTC)	negative	

hysA2 (All Other Than COL+USA300+NCTC)	positive	
hysA2-AllOther Than COL+USA300+NCTC	positive	
hysA2 (MRSA252)	negative	

ADHAESION FACTORS / GENES ENCODING MICROBIAL SURFACE COMPONENTS RECOGNIZING ADHESIVE MATRIX MOLECULES (MSCRAMM GENES)

name	result	explanation
bbp (total)	positive	Bone sialoprotein-binding protein
bbp (cons)	positive	
bbp (COL+MW2)	negative	
bbp (MRSA252)	negative	
bbp (Mu50)	positive	
bbp (RF122)	negative	
bbp (ST45)	negative	
clfA (total)	positive	Clumping factor A
clfA (cons)	positive	
clfA (COL+RF122)	positive	
clfA (MRSA252)	ambiguous	
clfA (Mu50+MW2)	ambiguous	
clfB (total)	positive	Clumping factor B
clfB (cons)	positive	
clfB (COL+Mu50)	negative	
clfB (MW2)	negative	
clfB (RF122)	positive	
cna	negative	Collagen-binding adhesin
ebh (cons)	positive	Cell wall associated fibronectin-binding protein
ebpS (total)	positive	Cell surface elastin binding protein
ebpS, probe 2	positive	
ebpS, probe 1	positive	
ebpS (01-1111)	negative	
ebpS (COL)	negative	
eno	positive	Enolase
efb / fib	positive	Fibrinogen binding protein (19 kDa)
efb / fib (MRSA252)	negative	
fnbA (total)	positive	Fibronectin-binding protein A
fnbA (cons)	positive	
fnbA (COL)	negative	
fnbA (MRSA252)	negative	
fnbA (Mu50+MW2)	negative	
fnbA (RF122)	negative	
fnbB (total)	negative	Fibronectin-binding protein B
fnbB (COL)	negative	
fnbB (COL+Mu50+MW2)	positive	
fnbB (Mu50)	ambiguous	
fnbB (MW2)	negative	
fnbB (ST15)	negative	
fnbB (ST45-2)	negative	

map (total)	positive	Major histocompatibility complex class II analog protein (=Extracellular adherence protein, eap)
map (COL)	positive	
map (MRSA252)	negative	
map (Mu50+MW2)	positive	
sasG (total)	positive	Staphylococcus aureus surface protein G
sasG (COL+Mu50)	positive	
sasG (MW2)	negative	
sasG (Other Than 252+122)	positive	
sdrC (total)	positive	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
sdrC (cons)	positive	
sdrC (B1)	negative	
sdrC (COL)	negative	
sdrC (Mu50)	positive	
sdrC (MW2+MRSA252+RF122)	positive	
sdrC (Other Than 252+RF122)	positive	
sdrD (total)	negative	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
sdrD (cons)	negative	
sdrD (COL+MW2)	negative	
sdrD (Mu50)	negative	
sdrD (other)	negative	
vwb (total)	positive	van Willebrand factor binding protein
vwb (cons)	positive	
vwb (COL+MW2)	negative	
vwb (MRSA252)	negative	
vwb (Mu50)	negative	
vwb (RF122)	positive	