

GENOTIPIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PARA LA EVALUACIÓN DE EFICACIA DE UNA VACUNA EXPERIMENTAL CONTRA MASTITIS BOVINA.

Gregoret Mateo

Laboratorio de Inmunología experimental, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas-UNL
Directora: Camussone, Cecilia
Codirector/a: Veaute, Carolina

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Mastitis bovina, *Staphylococcus aureus*, Vacuna

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intra-mamarias (IIM) causadas por *S. aureus* representan un problema económico y productivo en la industria lechera global. Afectan tanto a vacas en lactancia como a hembras bovinas jóvenes, propagándose al iniciar la lactancia. *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos mayores causantes de IIM aislado con mayor frecuencia en el mundo. Si bien las medidas tradicionales para el control de IIM que incluyen higiene, terapia antibiótica y descarte de animales crónicamente infectados han conducido a un progreso considerable en el control de la mayoría de los patógenos contagiosos, para el caso de *S. aureus* tienen eficacia limitada debido a la naturaleza crónica de estas infecciones y la resistencia a los antimicrobianos (Zecconi et al. 2006). Es por esto que el desarrollo de estrategias preventivas resulta crucial para reducir la incidencia de IIM por *S. aureus*, las pérdidas productivas y el uso de antimicrobianos.

En contexto expuesto, la vacunación se presenta como una herramienta prometedora. Sin embargo, las vacunas comercialmente disponibles en la actualidad, basadas en lisados bacterianos o microorganismos inactivados, han mostrado eficacia limitada (Pereira et al., 2011). Las limitantes observadas fueron atribuidas, al menos en parte, a que estas preparaciones obtenidas a tiempos fijos de cultivo no serían representativas de la totalidad de los factores de virulencia relevantes que se exponen durante una IIM.

Se ha propuesto que la eficacia de las vacunas podría aumentar si se incluyen antígenos representativos de las distintas etapas de la patogénesis. En este sentido, nuestro grupo de trabajo

Título del proyecto: Genotipificación y selección de cepas de *Staphylococcus aureus* para la evaluación de eficacia de una vacuna experimental contra mastitis bovina.

Instrumento: CAI+D Orientado
Año convocatoria: 2021
Organismo financiador: UNL
Directora: Veaute, Carolina



desarrolló un inmunógeno compuesto por moléculas recombinantes de factores de virulencia seleccionados de *S. aureus*, formulado con un adyuvante de nueva generación de producción propia. El mismo ha sido capaz de inducir una respuesta inmune humoral y celular en bovinos, y ha mostrado resultados prometedores en la reducción de nuevas IIM en un ensayo a campo en condiciones de exposición natural (Camussone et al., 2022).

Por otro lado, la evolución de la infección depende no solo de la respuesta inmune del animal sino también de los factores de virulencia del patógeno. Se ha observado que diferentes cepas de *S. aureus* son capaces de desencadenar respuestas inmunes variables y pudiendo afectar la gravedad de las IIM (Zbinden et al., 2014). Estas observaciones ponen en perspectiva la importancia de evaluar la capacidad protectora de las vacunas frente a una variedad de cepas con diferente potencialidad para establecer una infección en la glándula mamaria bovina, para garantizar su efectividad.

OBJETIVOS

1. Obtener aislamientos de *S. aureus* de establecimientos lecheros de la región, que presenten problemas recurrentes de mastitis por el microorganismo.
2. Estudiar la relación clonal de los aislamientos obtenidos y seleccionar el más prevalente en cada establecimiento
3. Seleccionar una cepa de *S. aureus* que pueda ser utilizada en un posterior ensayo de infección experimental.

METODOLOGÍA

Obtención de aislamientos de *S. aureus*:

Se tomaron muestras de leche compuesta de todas las vacas en lactancia de un establecimiento con más del 40% de prevalencia de mastitis por *S. aureus*. Estas muestras se sembraron en placas con medio Base suplementado con sangre bovina y se incubaron 18 horas a 37°C para identificar microorganismos de crecimiento rápido. Los microorganismos con características morfológicas y hemolíticas similares a *S. aureus* se sometieron a una prueba de coagulasa. Aquellos que arrojaron un resultado positivo se conservaron a -20°C para su confirmación por métodos moleculares.

Purificación de ADN genómico a partir de cultivos bacterianos compatibles con *S. aureus*:

Los aislamientos se reactivaron en placas con medio base suplementado con sangre bovina y luego se cultivaron en medio líquido durante 18 horas a 37°C. Luego, se centrifugaron y se obtuvo un pellet celular. A partir del mismo se obtuvo el ADN genómico usando un kit comercial (Promega).

Amplificación del gen *nucA* de *S. aureus* mediante PCR de punto final:

Los aislamientos presuntivos de *S. aureus* se confirmaron mediante PCR del gen *nucA*, utilizando primers específicos y condiciones de amplificación establecidas (Brakstad et al., 1992). Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa teñidos con GelRed.

Electroforesis en campo pulsado (PFGE):



Los aislamientos confirmados como *S. aureus* se caracterizaron genéticamente en pulsotipos (PT) utilizando análisis de macrorestricción de ADN genómico total con la enzima *SmaI* y separación mediante PFGE, según descripciones previas (Camussone et al., 2020). Luego se construyó un dendrograma utilizando softwares especializados (CLIQS 1D Pro, TotalLab, EEUU). Se utilizó una línea de corte para la diferenciación entre Clusters del 80%. Dentro de un mismo Cluster, los aislamientos con idéntico patrón de bandas se consideraron pertenecientes al mismo pulsotipo (PT).

RESULTADOS

Se estudiaron 88 muestras, de las cuales 69 (78,4%) dieron positivo a la prueba de la coagulasa, 3 negativos (3,4%) y 16 resultaron dudosas (18,2%). Sin embargo, debido la morfología observada en las colonias, compatible con *S. aureus*, todos los aislamientos se conservaron.

Luego de realizar la amplificación por PCR de punto final del gen *nucA*, la totalidad de las muestras procesadas pudo confirmarse como *S. aureus*. De las mismas, se tomaron al azar 69 cepas a las cuales se las evaluó mediante PFGE, proporcionando información sobre la distribución de los fragmentos genómicos generados. Con esta información fue posible realizar un análisis informático que permitió agrupar las muestras en distintos clusters. Se observaron dos Clusters principales, “1”, y “2”, conteniendo el Cluster “1” al 96 % de las cepas evaluadas. Dentro del mismo, se observó un PT ampliamente predominante sobre el resto, compuesto por 46 (67%) cepas (Figura 1).

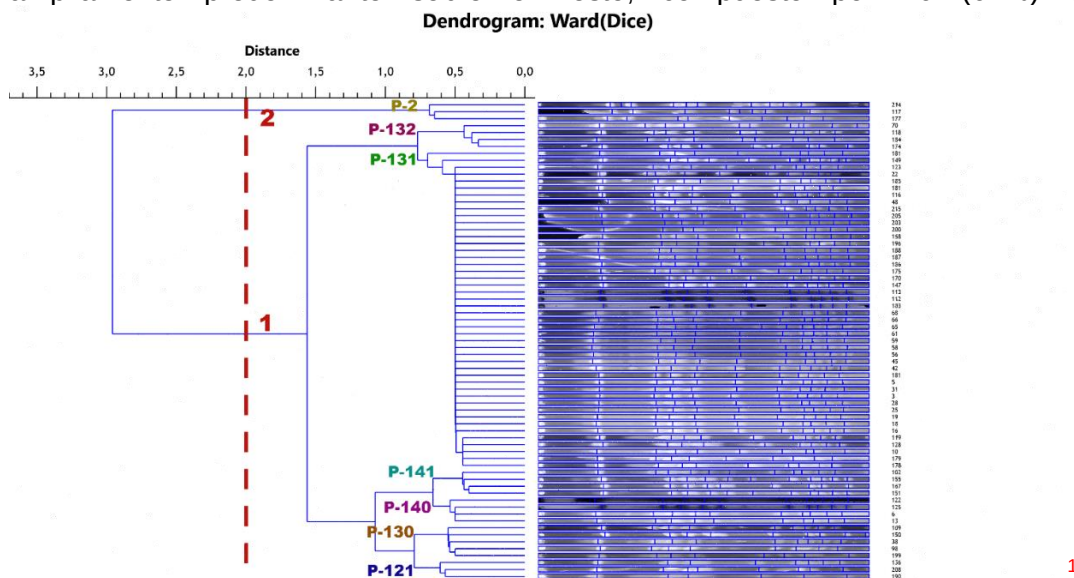


Figura 1: Dendrograma de los perfiles de PFGE de aislamientos de *S. aureus*. La línea punteada indica el punto de corte (80%) para la diferenciación de Clusters (1 y 2). La nomenclatura “P-XXX” refiere a los distintos PT obtenidos dentro de un mismo Cluster.

CONCLUSIONES

Estos resultados permitieron detectar un PT dominante dentro del entorno estudiado, lo que sugiere una fuerte homogeneidad genética en las cepas de *S. aureus* presentes. La información obtenida permitirá seleccionar adecuadamente las cepas para próximos ensayos de eficacia de las formulaciones vacunales desarrolladas en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Brakstad O, Aasbakk K, Maeland J, 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1654-1660.

Camussone C, Molineri A, Signorini M, Neder V, Vitulich C, Calvino LF. 2020. Risk factors and molecular characterization of *S. aureus* mastitis in dairy heifers in Argentina. *J Dairy Res.* 87,82-88.

Camussone C, Reidel I, Molineri A, Cicotello J, Miotti C, Suarez Archilla G, Curti C, Veaute C, Calvino L. 2022. Efficacy of immunization with a recombinant *S. aureus* vaccine formulated with liposomes and ODN-CpG against natural *S. aureus* intramammary infections in heifers and cows. *Res Vet Sci.* 145, 177-187.

Pereira UP, Oliveira D, Mesquita LR, Costa GM, Pereira LI. 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Vet. Microbiol.* 148, 117–124.

Zbinden C, Stephan R, Johler S, Borel N, Bünter J, Bruckmaier RM, Wellnitz O. 2014. The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* strains is linked to the bacterial phenotype. *PLoS One.* 9(1):e87374.

Zecconi A, Calvino L, Fox L. 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 408, 1-36.