

## PREVALENCIA DE GENES DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DE ORIGEN BOVINO AISLADAS DE SANTA FE Y CÓRDOBA

Molina, Matías<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cientibecario.Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL  
Director/a: Pereyra Elizabet  
Codirector/a: Dallard Bibiana

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes del ganado vacuno que genera grandes pérdidas económicas a los productores y la industria láctea mundial (Hogeveen y col., 2011). Además, afecta la imagen del sector lechero, debido al uso inadecuado de antibióticos y el impacto de sus residuos en la Salud Pública por la potencial emergencia de bacterias resistentes (De Vliegheer y col., 2012). Si bien la mastitis es causada por numerosos agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina (Calvinho y Tirante, 2005), como en otros países de gran desarrollo lechero (Reyher y col., 2011). Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con recuentos elevados de células somáticas y persistencia de las bacterias en la glándula mamaria (GM) (Bardiau y col., 2014). Este tipo de manifestación es la que causa mayores perjuicios a los productores lecheros debido a su elevada prevalencia y carencia de síntomas evidentes, lo que contribuye a que animales asintomáticos actúen como reservorios de la enfermedad y contribuyan a la rápida propagación de la bacteria dentro del rodeo (Bradley y col., 2007).

En la última década numerosos genes de virulencia de *S. aureus* (*spa IgG-binding*, *spa X-región*, *nuc*, *clfA*, *clfB*, *coa*, *hla*, *hly*, *fnbA*, *fnbB*, *cap*, *agrI*, *agrII*, *agrIII*, *icaA*, *icaD*, *icaC*, *bap*) han sido descritos en aislamientos provenientes de mastitis bovina (Bardiau y col., 2014). Además, ciertos genes pueden estar asociados con determinantes de resistencia (*mecA*, *blaZ*) e hipervirulencia (Haverly y col., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que *S. aureus* posee diferentes habilidades para colonizar el tejido y diseminarse dentro de la GM y que estas diferencias son debidas a la expresión de los Factores de virulencia (Klein y col., 2012), los cuales influyen en la difusión en el rodeo.

Estudios epidemiológicos moleculares sobre aislamientos de *S. aureus* bovinos han demostrado que un gran número de tipos están implicados en la etiología de la mastitis en todo el mundo y que ciertos tipos parecen predominar dentro de regiones geográficas (Lundberg y col., 2014).



Título del proyecto: *Estudio de la diversidad genética de cepas de Staphylococcus aureus de origen bovino de diferentes regiones de Argentina. Prevalencia y expresión de los principales genes de virulencia*

Instrumento: CAI+D 2016

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Dra. Elizabet Pereyra

## OBJETIVOS

Evaluar la prevalencia de los principales genes de virulencia relacionados con la patogenicidad de *S. aureus* a partir de aislamientos provenientes de IIM (infecciones intramamarias) subclínicas de origen bovino de diferentes regiones de Santa Fe y Córdoba.

## METODOLOGÍA

**Aislamientos bacterianos:** Se colectaron 86 cepas de *S. aureus* desde el año 2006 a 2016 de origen bovino con IIM subclínicas de diferentes tambos ubicados en la provincia de Santa Fe. Específicamente en las ciudades de Esperanza y Rafaela y de tambos de la provincia de Córdoba, ubicados en las ciudades de Río Cuarto, Río Segundo y General San Martín. En tambos de Esperanza y Rafaela se aislaron 18 cepas de cada región. Mientras que 23, 20 y 7 cepas se aislaron en tambos de Río Cuarto, Río Segundo y General San Martín, respectivamente. Las cepas fueron cedidas por laboratorios de diagnóstico y por diferentes instituciones educativas pertenecientes a organismos públicos. Las bacterias fueron almacenadas en glicerol 10% (v/v) a -80°C hasta el momento de la realización de las pruebas moleculares.

**Caracterización bioquímica y molecular:** la confirmación de los aislamientos como *S. aureus* se realizó según procedimientos estándar (Oliver y col., 2004). La identificación de especie se demostró mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos descritos por Martineau y col. (1998), que amplificaron un fragmento del gen Sa422 de 108 pares de bases (pb). Previo a la realización de las PCR se procedió a extraer y purificar ADN genómico de todos los aislamientos de *S. aureus* siguiendo la metodología descrita por Kumar y col. (2008).

**Evaluación de la prevalencia de genes que codifican para la expresión de proteínas de adherencia, internalización y formación de biofilm:** Para evaluar la diversidad de los genes relacionados con la adherencia e invasión de *S. aureus* a células del hospedador y formación de biofilms se realizó la extracción de ADN genómico de todos los aislamientos aplicando el método descrito por Kumar y col. (2008). Posteriormente se realizó PCR convencional utilizando oligonucleótidos para amplificar los siguientes genes relacionados con adherencia e internalización: *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *fib* y genes que intervienen en la formación de biofilms: *icaA*, *icaD*, *icaC* y el gen *bap*. Se utilizó la metodología empleada previamente en el laboratorio (Pereyra y col., 2016).

**Determinación de la prevalencia de los diferentes grupos agr (gen accesorio regulador):** Los grupos *agr* fueron determinados mediante PCR multiplex utilizando primers para los cuatro grupos *agr* (I, II, III y IV) siguiendo la metodología previamente descrita por Gilot y col. (2002).

**Caracterización de la región variable X y región de unión a IgG de spa.** Se evaluó por PCR convencional a partir de ADN genómico de todos los aislamientos según la metodología empleada por Reinoso y col. (2008). Para amplificar el segmento que codifica para la región variable X de *spa* se utilizó la secuencia publicada por (Frénay y col., 1996) que amplifica un fragmento de 315 pb. Por otra parte, se evaluó la región de unión a IgG de *spa* utilizando la secuencia génica publicada por Seki y col., (1998) que amplifica un fragmento de aproximadamente 900 pb.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Los resultados de prevalencia que se obtuvieron de los genes que codifican para la expresión de proteínas de adherencia e internalización: *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, fueron elevadas en todas las regiones evaluadas, entre un 90% y 100% y se detallan en la tabla 1

En general en nuestros ensayos, el locus *ica* mostró prevalencia elevada y uniforme; observándose para *icaADC* 100%, mientras el 100% resultó *bap* negativa, coincidiendo con la bibliografía encontrada.

Lo que se pudo observar hasta el momento, que la mayoría de las cepas de origen subclínica presentan el gen *agrI*, encontrándose solo en tres cepas *agrII* positivos y no se detectaron cepas *agrIII* o *agrIV* en todos los aislados.

Con respecto a la prevalencia de los genes que codifican para la región variable X y región de unión a IgG de *spa* fueron elevados los porcentajes de prevalencia evaluados.

Regiones	Factores de virulencia										región variable x		binding			
	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>fib</i>	<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	<i>spa</i>	<i>spa</i>	<i>agrI</i>	<i>agrII</i>	<i>agrIII</i>	<i>agrIV</i>	
Esperanza	94,44	100	88,88	77,77	100	100	100	100	0	94,44	88,88	100	0	0	0	
Rafaela	100	9,44	100	88,88	94,44	100	100	100	0	88,88	94,44	83,33	16,66	0	0	
%																
<b>Prevalencia</b>	<b>97,22</b>	<b>97,22</b>	<b>94,44</b>	<b>83,32</b>	<b>97,22</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>91,66</b>	<b>91,66</b>	<b>91,66</b>	<b>16,66</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	
Río Segundo	85	95	100	95	90	100	100	100	0	95	100	100	0	0	0	
San Martín	100	100	57,14	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0	0	
Río Cuarto	100	91,3	69	56	100	100	100	100		100	100	100	0	0	0	
%																
<b>Prevalencia</b>	<b>95</b>	<b>95,43</b>	<b>75,38</b>	<b>83,66</b>	<b>96,66</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>97,5</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	

Tabla1. Porcentajes de prevalencias de genes de virulencia de las provincias de Santa Fe y Córdoba.

A partir de los resultados obtenidos se demostró que en todas las cepas estudiadas, independientemente del área geográfica, presentaron una alta prevalencia de los factores de virulencia más relevantes. Estos datos aportan información regional para el futuro diseño de inmunógenos multicomponentes dirigidos a prevenir las IIM por *S. aureus*.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bardiau M., Detilleux J., Farnir F., y col.**, 2014. Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.*, 169,74-79.
- Bradley AJ., Leach KA., Breen JE., y col.**, 2007. Survey of the incidence and a etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Res.*, 160, 253-257.
- Calvinho LF., Tirante L.**, 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 4, 29-40.
- De Vlieghe S., Fox LK., Piepers S., y col.**, 2012. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.*, 95, 1025-1040.
- Frénay H., Bunschoten A., Schouls L., y col.**, 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 15, 60-64.
- Gilot P., Lina G., Cochard T., Poutrel B.**, 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNAIII-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol.*, 40, 4060-4067.
- 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.
- Hogeveen H., Pyorala S., Persson Waller K., Hogan JS., Lam TJGM., Oliver SP., Schukken YH., Barkema HW., Hillerton JE.**, 2011. Current Status and Future Challenges in Mastitis Research in Natl. Mastitis Counc. Ann. Mtg. Proc., Natl. Mastitis Counc., Inc., Madison WI., 36-48
- Klein RC., Fabres-Klein MH., Brito MA., y col.**, 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.*, 160, 183-188.
- Kumar R., Yadav BR., Dev K., Singh RS.**, 2008. Simple protocol for DNA extraction from *Staphylococcus aureus*. <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/A-Simple-Protocol-for-DNA-Extraction-from-Staphylococcus-Aureus-4999.html>
- Lundberg A., Aspán A., Nyman A., y col.**, 2014. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *S. aureus* mastitis. *Acta Vet Scand.* 56(1):2.
- Martineau F., Picard FJ., Roy PH., Ouellette M., Bergeron MG.**, 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.*, 36, 618-623.
- Oliver SP, Gonzalez RN, Hogan JS, y col.**, 2004. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*, 4th edition. National Mastitis Council, Verona, WI, USA.
- Pereyra EAL., Picech F., Renna MS., Baravalle C., Andreotti CS., 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.
- Reinoso EB., El-Sayed A., Lämmler C., y col.**, 2008. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol Res.*, 163, 314-322.
- Reyher KK., Dufour S., Barkema HW., Des Côteaux L., DeVries TJ., Dohoo IR., Keefe GP., Roy JP., and Scholl DT.**, 2011. The National Cohort of Dairy Farms-A data collection platform for mastitis research in Canada. *J Dairy Sci.*, 94, 1616–1626
- Seki K., Sakurada J., Seong H., y col.**, 1998. Occurrence of coagulase serotype among *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy individuals – special reference to correlation with size of protein-A gene. *Microbiol Immunol.*, 42, 407-409.