



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES, DE LA
FORMACIÓN DE BIOFILM Y DE LA INVASIÓN CELULAR EN
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE VACAS CON
MASTITIS PERSISTENTES Y TRANSITORIAS**

HELEN NAVEA PÉREZ

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Santiago de Chile

2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE POLISACÁRIDOS CAPSULARES, DE LA
FORMACIÓN DE BIOFILM Y DE LA INVASIÓN CELULAR EN
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE VACAS CON
MASTITIS PERSISTENTES Y TRANSITORIAS**

HELEN NAVEA PÉREZ

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Directora de tesis: Dra. Angélica Reyes Jara

Santiago de Chile

2018

DEPARTAMENTO Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, y contó con financiamiento del Proyecto Fondecyt 1171805, dirigido por el Dr. José Manuel Munita, director del Centro de Genómica Microbiana de la Universidad del Desarrollo.

Además, los ensayos de invasión celular de esta tesis se realizaron en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina, gracias a una beca de “estadías cortas” otorgada por la Unidad de Internacionalización del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

Los ensayos de “concentración inhibitoria mínima” de esta tesis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Cepas de *S. aureus* y partidores del gen *cap8* fueron facilitados por el Laboratorio de Vacunas Veterinarias (VACCIVET) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

BIOGRAFÍA

Helen Navea nació el 2 de diciembre de 1987 en Madrid, España, debido a que su familia se trasladó desde Chile a Madrid unos meses antes de su nacimiento. Regresó a Chile a los 4 años, momento en el que ingresó al colegio que la acogería hasta sus 18 años: Liceo Católico Atacama, de la ciudad de Copiapó. A los 18 años se trasladó a Santiago para estudiar Medicina Veterinaria en la Universidad Mayor. A partir de su tesis de pregrado realizada entre los años 2012-2013, Helen no volvió a salir de un laboratorio, decidida a dedicarse a la investigación. Es así como en el año 2015 ingresó al programa de Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me apoyaron y acompañaron en este proceso: Me gustaría agradecer a mis padres que, a pesar de la distancia, nunca fallaron con sus cariñosas palabras de aliento.

También quisiera agradecer a mi profesora tutora, la Dra. Angélica Reyes, por guiarme y darme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en su laboratorio, así como también al Dr. José Manuel Munita, director del Centro de Genómica Microbiana de la Universidad del Desarrollo.

Agradezco a mis profesores correctores, el Dr. Leonardo Sáenz y la Dra. Consuelo Borie, por su apoyo y disposición para con este proyecto de investigación.

Le agradezco desde lo más profundo a la Dra. Consuelo Borie, por sus certeras palabras y por el apoyo que no dudó en ofrecerme.

También quisiera agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular aplicada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina, en especial a mi profesora tutora, la Dra. Bibiana Dallard, y a mis compañeras “Eli”, “Sofi”, “Carli”, “Andre”, “Sol”, “Celi” y “Meli”, por el cariñoso recibimiento, la cariñosa estadía y la cariñosa despedida. Gracias a Eli por haberme recibido con los brazos abiertos.

Quisiera agradecer también a mis amigos que me acompañaron en este proceso: a Ángel Parra, Estefanía Gazmuri, María José Valenzuela, Francisca Castro y Aldo Maddaleno. Gracias por haber estado para mí en este proceso y en tantos otros. Gracias a Ángel por no sólo haberme acompañado en este proceso, sino también por haber aportado a esta tesis con sus conocimientos.

Por último, quisiera agradecer a mi marido Christian, a quién le dedico este proyecto: Gracias por haberme dado el aliento y el valor que necesité para continuar.

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
SUMMARY	10
1.INTRODUCCIÓN	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Mastitis Bovina.....	13
2.2. <i>S. aureus</i> como agente patógeno causante de mastitis bovina.....	15
2.2.1. Resistencia antimicrobiana en cepas de <i>S. aureus</i> causantes de MB..	17
2.2.2. Polisacáridos capsulares	18
2.2.3. Formación de Biofilm	19
2.2.4. Invasión celular.....	23
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo general.....	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. METODOLOGÍA	28
5.1. Colección de aislados de <i>S. aureus</i>	28
5.2. Preselección de aislados de <i>S. aureus</i> provenientes de vacas con mastitis persistentes y de vacas con mastitis transitorias.....	28
5.3. Análisis de PCR de <i>S. aureus</i>	29
5.4. Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)	29
5.5. Ensayos de resistencia antimicrobiana	31
5.6. Genotipificación capsular de <i>S. aureus</i>	33
5.7. Ensayos de formación de biofilm de <i>S. aureus</i> en microplaca de 96 pocillos	33
5.8. Ensayos de invasión de <i>S. aureus</i> en células MAC-T	35
5.9. Análisis estadístico	37
6.- RESULTADOS.....	38

6.1. Preselección de aislados de <i>S. aureus</i> provenientes de vacas con mastitis persistente y de vacas con mastitis transitoria	38
6.2. Caracterización y tipificación de aislados de <i>S. aureus</i> provenientes de vacas con mastitis persistentes y transitorias mediante pruebas de resistencia antimicrobiana y PFGE.	41
6.3. Determinación de la presencia de los genes <i>cap5</i> y <i>cap8</i> en el genoma de cepas de <i>S. aureus</i> procedentes de mastitis persistentes y de mastitis transitorias.	45
6.4. Evaluación de la capacidad de formación de biofilm de cepas de <i>S. aureus</i> y determinación de la presencia de genes relacionados con dicho factor de virulencia según la procedencia de las cepas	46
6.5. Evaluación de la capacidad de invasión celular de cepas de <i>S. aureus</i> según su procedencia	50
7. DISCUSIÓN	54
8. CONCLUSIONES	67
9. PROYECCIONES	68
10. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los partidores utilizados para la identificación de los genes <i>cap5</i> y <i>cap8</i> en el genoma de aislados de <i>S. aureus</i>	33
Tabla 2. Descripción de los partidores utilizados para la identificación de los genes del operón <i>icaADBC</i> , del gen <i>bap</i> y de los genes <i>fnbA</i> y <i>fnbB</i> en el genoma de aislados de <i>S. aureus</i>	35
Tabla 3. Origen de los aislados de <i>S. aureus</i> preseleccionados para el estudio. .	38
Tabla 4. Pruebas confirmatorias para la identificación de aislados de <i>S. aureus</i> . 40	
Tabla 5. Características genómicas y de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de <i>S. aureus</i> incluidas en el estudio.	49
Tabla 6. Capacidad de invasión de células MAC-T expresada en Log10 de las cepas de <i>S. aureus</i> incluidas en el estudio.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de Biofilm de <i>Staphylococcus sp.</i> (adaptado de Otto, 2013).	20
Figura 2. Frecuencia de sensibilidad antimicrobiana de los 30 aislados de <i>S. aureus</i> según los 12 antibióticos evaluados.	42
Figura 3. Distribución de los aislados de <i>S. aureus</i> en base a su similitud genética determinada mediante PFGE.....	43
Figura 4. Caracterización de cepas de <i>S. aureus</i> provenientes de MP y MT, según su genotipificación capsular.	45
Figura 5. Distribución de las cepas de <i>S. aureus</i> de acuerdo con su capacidad de formación de biofilm y su origen.....	47
Figura 6. Comparación entre grupos de cepas de <i>S. aureus</i> provenientes de vacas con MP y de vacas con MT respecto a su producción <i>in vitro</i> de biofilm	48
Figura 7. Comparación entre grupos de cepas de <i>S. aureus</i> provenientes de vacas con MP y de vacas con MT respecto a su capacidad <i>in vitro</i> de invasión celular...	51
Figura 8. (A) Capacidad <i>in vitro</i> de formación de biofilm expresada como el promedio de Log10 de las densidades ópticas de las cepas de <i>S. aureus</i> incluidas en el estudio; (B) capacidad <i>in vitro</i> de invasión celular expresada como el promedio de Log10 de las UFC recuperadas/mL de las cepas de <i>S. aureus</i> incluidas en el estudio.	52

RESUMEN

La mastitis bovina es la enfermedad de mayor prevalencia en la industria lechera y la de mayor importancia, ya que provoca enormes pérdidas económicas que oscilan entre el 30 y el 70% de las pérdidas totales. El principal problema a nivel productivo está representado por la mastitis subclínica, la cual tiende a la persistencia o cronicidad, y a ser refractaria a tratamiento antibiótico. Este tipo de mastitis es comúnmente causado por *Staphylococcus aureus* y suele ser la forma de presentación más frecuente en los planteles lecheros a nivel mundial.

El objetivo de esta tesis fue determinar diferencias entre cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes y de vacas con mastitis transitorias respecto a su capacidad de formación de biofilm e invasión celular, y a su genotipificación capsular. Para ello, se seleccionaron aislados provenientes de mastitis bovinas persistentes y transitorias, que fueron caracterizados según su perfil de resistencia a antibióticos y tipificados mediante la técnica de Electroforesis en Campo Pulsado (Pulsed-Field). Se evaluó *in vitro* la formación de biofilm en placas de 96 pocillos y la invasión celular con células MAC-T. La genotipificación capsular (*cap5-cap8*) de las cepas se llevó a cabo mediante técnica de PCR. Además, mediante esta misma técnica se realizó la detección de los genes implicados en la formación de biofilm e invasión celular (operón *icaADBC*, *bap*, *fnbA*, *fnbB*).

Se lograron identificar aislados de *S. aureus* persistentes y transitorios (n=30) en la glándula mamaria bovina mediante PFGE. Dichos aislados se agruparon en diferentes pulsotipos, demostrando una elevada diversidad genética, y en general fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados (n=12), incluida la meticilina. El gen *cap5* fue el de mayor frecuencia, pesquisándose en todas las cepas provenientes de vacas con mastitis persistentes y en una cepa proveniente de una vaca con mastitis transitoria; el resto de las cepas fueron “no tipificables”. Todas las cepas analizadas fueron capaces de formar biofilm, sin embargo, las cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes formaron mayor cantidad de biofilm que las cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis transitorias. En paralelo, todas las cepas fueron capaces de invadir células MAC-T, sin embargo, esta última capacidad fue baja en general y no se asoció con la manifestación de la mastitis o con el origen de las cepas (cepas provenientes de vacas con mastitis persistentes o mastitis transitorias). En conclusión, las cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes codificaron en su genoma el gen *cap5* y formaron mayor cantidad de biofilm que las cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis transitorias.

Palabras claves: *S. aureus*, mastitis bovina, persistencia, cápsula, biofilm, invasión celular.

SUMMARY

Bovine mastitis is the most prevalent and important disease in the dairy industry, since it causes huge economic losses ranging among 30 and 70% of total losses. The main problem at the production level is represented by subclinical mastitis, which tends to persistence or chronicity and to be refractory to antibiotic treatment. This type of mastitis is commonly caused by *Staphylococcus aureus* and is usually the most frequent form of presentation in dairy farms in the world.

The aim of this thesis was to determine differences between strains of *S. aureus* from cows with persistent mastitis and cows with transient mastitis respect to their biofilm formation capacity, cell invasion capacity, and their capsular genotyping. Isolates from persistent and transient bovine mastitis were selected and characterized according to their antibiotic resistance profile and typed by the Pulsed-Field technique. The formation of biofilm in 96 well plates and the cellular invasion with MAC-T cells were evaluated. Capsular genotyping (*cap5-cap8*) of the strains was carried out by PCR technique. In addition, the detection of the genes involved in the formation of biofilm and cellular invasion (operon *icaADBC*, *bap*, *fnbA*, *fnbB*) was carried out using the same technique.

It was possible to identify persistent and transient *S. aureus* isolates (n=30) in the bovine mammary gland using the Pulsed-Field technique. Those isolates were grouped into different pulsotypes showing a high genetic diversity, and in general were sensitive to all antibiotics tested (n=12), including methicillin. The *cap5* gene was the most frequent, being identified in all strains from cows with persistent mastitis and in one strain from a cow with transient mastitis; the rest of the strains were "non-typeable". All the strains were able to form biofilm, however, strains of *S. aureus* from cows with persistent mastitis formed more biofilm than strains of *S. aureus* from cows with transient mastitis. In parallel, all the strains were able to invade MAC-T cells, however, this last capacity was low in general and was not associated with the manifestation of mastitis or with the origin of the strains (strains from cows with persistent mastitis or transient mastitis). In conclusion, *S. aureus* strains from cows with persistent mastitis encoded the *cap5* gene in their genome and formed more biofilm than *S. aureus* strains from cows with transient mastitis.

Key words: *S. aureus*, bovine mastitis, persistence, capsule, biofilm, cell invasion.

1.INTRODUCCIÓN

Los avances en el campo de la reproducción y nutrición animal, junto con los métodos de explotación del ganado vacuno lechero, han jugado un papel importante en el aumento de la producción de leche durante los últimos veinte años, lo que ha logrado satisfacer la gran demanda de productos lácteos que existe a nivel mundial (Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013; FAO, 2014). Es así como la mastitis bovina (MB) desempeña un papel decisivo en la industria lechera ya que, al perturbar la salud y el bienestar del ganado vacuno lechero, provoca enormes pérdidas económicas que oscilan entre el 30 y el 70% de las pérdidas totales según el tipo de mastitis presente en el plantel (Ranjan *et al.*, 2011; Saidi *et al.*, 2013; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013). Si bien la presentación de la mastitis puede ser clínica, el principal problema a nivel productivo está representado por la mastitis subclínica, la cual tiende a la cronicidad y a ser refractaria a tratamiento antibiótico. Este tipo de mastitis es comúnmente causado por *Staphylococcus aureus* y suele ser la forma de presentación más frecuente en los planteles lecheros a nivel mundial.

Numerosos estudios avalan la teoría de que el progreso de la infección intramamaria por *S. aureus* hacia la resolución o la cronicidad (persistencia) podría estar relacionado con las características de la cepa y con la expresión de combinaciones específicas de sus factores de virulencia (Fournier *et al.*, 2008; Le Maréchal *et al.*, 2011; Pereyra, 2015), entre estos, la capacidad de formación de biofilm e invasión celular, y la producción de polisacáridos capsulares. Está demostrado que *S. aureus* es capaz de evadir tanto el sistema inmune del hospedero como los tratamientos antibióticos aplicados en las vacas infectadas gracias a la producción de polisacáridos capsulares y a su capacidad de formar biofilm y de invadir células epiteliales mamarias (Hensen *et al.*, 2000; Camussone & Calvihno, 2013; Boonyayatra *et al.*, 2016; Bardiau *et al.*, 2016), lo que podría contribuir a la persistencia de la enfermedad independiente de la susceptibilidad antimicrobiana demostrada por los aislados en ensayos *in vitro* (Melchior *et al.*, 2007; Pereyra, 2015).

En base a la información reportada y tomando en cuenta que el progreso de la infección intramamaria hacia la persistencia podría estar relacionado con las características de la cepa y con la expresión de combinaciones específicas de sus factores de virulencia, en esta tesis se postula que cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes poseen mayor capacidad *in vitro* de formar biofilm y de invadir células epiteliales mamarias, a diferencia de aquellas cepas de *S. aureus* que provienen de vacas con mastitis transitorias.

Previamente, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio de la caracterización microbiológica de leche de vacas provenientes de predios de la zona centro y sur del país (Proyecto FIA PYT-2013-0030). Los muestreos fueron realizados mensualmente y, además, se realizó un recuento de las células somáticas (RCS) de cada muestra. Las mismas vacas fueron muestreadas por al menos 4 meses consecutivos. En este sentido, se identificaron vacas que presentaron cuadros de mastitis persistentes (mastitis por al menos 4 meses consecutivos) y cuadros de mastitis transitorias causadas por *S. aureus*. Para llevar a cabo este estudio, dispusimos de cepas de *S. aureus* de mastitis persistentes y transitorias.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mastitis Bovina

La mastitis bovina (MB) es la enfermedad más prevalente en la producción de ganado vacuno lechero a nivel mundial, y si bien se encuentra bien documentada en los países desarrollados, en los países en vías de desarrollo la información disponible es muy limitada (FAO, 2014). Esta es una enfermedad multifactorial y de etiología múltiple, que se define como la inflamación del parénquima de la glándula mamaria, caracterizándose por cambios en la composición bioquímica de la leche y cambios patológicos en el tejido glandular (FAO, 2014). La inflamación de la glándula mamaria puede deberse a la acción de agentes infecciosos, traumas físicos y/o irritantes químicos, siendo la invasión y multiplicación bacteriana la causa más común (Castillo *et al.*, 2009; De Vlieghe *et al.*, 2012). Según sus formas de presentación, la mastitis puede ser clasificada como clínica o subclínica, siendo esta última la que está presente comúnmente en la mayoría de los planteles:

- Mastitis clínica: Se evidencia por cambios físicos en la glándula mamaria, estando presentes los cinco signos cardinales de la inflamación de la ubre (enrojecimiento, calor, inflamación, dolor y pérdida de la producción de leche), y con afección del estado general del animal como consecuencia de septicemia. La composición organoléptica de la leche se ve alterada (Pedraza, 1991; Saidi *et al.*, 2013).
- Mastitis subclínica: esta es la forma más frecuente de presentación, siendo 15 a 40 veces más frecuente que la presentación clínica; su diagnóstico se realiza mediante el Recuento de Células Somáticas (RCS) en la leche, donde un RCS mayor a 200.000 CS/mL de leche se considera como un cuadro de mastitis subclínica (De Vlieghe *et al.*, 2012).

La mastitis subclínica es un cuadro de larga duración y de difícil detección que llega a constituirse en una forma de reservorio de microorganismos que facilita el contagio entre animales debido a que los rebaños afectados no evidencian cambios en el estado sanitario y no se ve afectada la composición organoléptica de la leche, por lo que su diagnóstico es un reto tanto para la industria lechera como en la práctica veterinaria (Valera *et al.*, 2005; FAO, 2014).

De las diversas manifestaciones, la mastitis subclínica es económicamente la más importante debido a sus efectos a largo plazo sobre la producción de leche (Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013), mientras que la mastitis clínica es responsable del 30% de las pérdidas económicas, la mastitis subclínica es responsable de aproximadamente el 70% de ellas (Ranjan *et al.*, 2011; Saidi *et al.*, 2013; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013). Las pérdidas económicas se deben a una disminución en la producción de leche, el desecho de leche de mala calidad organoléptica, la retención de leche por residuos de antibióticos proveniente de vacas sometidas a terapia antibiótica, sanciones en los precios debido al alto recuento de CS/ml y costos de los fármacos y servicios veterinarios (Abdel-Rady & Sayed, 2009).

En base a sus características epidemiológicas, los patógenos causantes de mastitis se dividen en dos grupos: agentes contagiosos, para los cuales su depósito primario es una ubre infectada, y agentes ambientales que se encuentra regularmente en el medio ambiente, causando mastitis ambiental:

Mastitis ambiental: La mastitis ambiental es causada por patógenos potenciales que generalmente se encuentran en el tracto digestivo del ganado (coliformes) o en su entorno (heces, suelo, material de cama y estiércol). Estos microorganismos proliferan sustancialmente en las camas, lo que aumenta la probabilidad de infección de la glándula mamaria. Los principales microorganismos considerados como ambientales son: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Prototheca zopfii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia*

asteroides y *Clostridium perfringens* (Gasque, 2008; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013). En Chile, el sistema de producción intensivo es practicado en la zona central del país, caracterizándose por la alta densidad animal y el acúmulo de materia orgánica, lo que favorece la presencia de estos microorganismos (NMC, 1987; Concha, 2007).

Mastitis contagiosa: La mastitis contagiosa es causada por patógenos bacterianos cuyo hábitat principal es la piel de la ubre y el canal del pezón; no pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el medio ambiente y por lo general se transmiten de una vaca a otra a través de la máquina de ordeña y de las manos de los ordeñadores. Este tipo de mastitis se asocia a sistemas de explotación extensivos (en pradera), como ocurre en la zona sur de Chile (Harmon, 1996; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013). Los patógenos asociados a mastitis contagiosa son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulasa-negativos, *Mycoplasma bovis* y *Corynebacterium bovis* (De Vliegher *et al.* 2012; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013).

2.2. *S. aureus* como agente patógeno causante de mastitis bovina

La mayoría de los casos de mastitis bovina tienen un origen bacteriano, siendo *Staphylococcus* spp. los agentes causantes más prevalentes en el mundo. Históricamente, las especies de *Staphylococcus* han sido clasificadas en *Staphylococcus* coagulasa-positiva (SCP) y *Staphylococcus* coagulasa-negativa (SCN) (Arslan *et al.*, 2009). El patógeno coagulasa-positivo mayormente reconocido en los casos de mastitis clínica y subclínica en el mundo es *S. aureus*, que causa más del 25% de las infecciones intramamarias; de los casos de mastitis contagiosa, *S. aureus* causa más del 95% de ellas (Arslan *et al.*, 2009; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013). A pesar de que existen otras especies de SCP aisladas de mastitis bovina (entre estos *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. lutrae*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. chromogenes* y *S. xylosus*), la mayoría de las cepas (más del 88%) son identificadas como *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas y moleculares (Capurro, 1999).

S. aureus es un patógeno ubicuo, Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil, catalasa-positivo, coagulasa-positivo que no forma esporas. Es un patógeno mesófilo, su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C a 40°C, y su pH óptimo es entre 6 – 7. Se destaca por tolerar altas concentraciones de cloruro de sodio (hasta el 15%) y puede crecer y sobrevivir a baja actividad de agua (0,86). Produce enterotoxinas a temperaturas entre 10°C y 46°C y generalmente es considerado como una de las principales causas de mastitis contagiosa en el ganado vacuno lechero (Schelin *et al.*, 2011).

S. aureus posee la capacidad de propagarse rápidamente en el rebaño, resultando en un gran número de vacas infectadas. Si bien la presencia de *S. aureus* en la leche es un tema de importancia en la salud pública debido a que algunas cepas poseen la capacidad de producir una gran variedad de toxinas, el mayor problema que representa en los planteles lecheros es que es capaz de causar mastitis generalmente persistentes o crónicas, que suelen no responder al tratamiento antibiótico, generando grandes pérdidas económicas (Arslan *et al.*, 2009; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013).

Si bien son diversos los métodos para prevenir y controlar la MB, la terapia con antibióticos desempeña un papel determinante en la eliminación de la infección, aun cuando esta práctica lleve a la selección de cepas resistentes que intervienen de manera negativa en el tratamiento (Pellegrino *et al.*, 2011). Antibióticos como penicilina, cefalosporina y tetraciclina son utilizados en los planteles lecheros para tratar y prevenir las mastitis causadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, sin embargo, la eficacia de estos antibióticos puede verse comprometida por la aparición de resistencia antimicrobiana en patógenos como *S. aureus*. Por esta razón, *S. aureus* es el principal microorganismo investigado en los estudios de resistencia antimicrobiana al ser aislados de mastitis bovina (Beuron *et al.*, 2014).

2.2.1. Resistencia antimicrobiana en cepas de *S. aureus* causantes de MB

Hoy en día el estudio de la resistencia antimicrobiana de las cepas causantes de infecciones intramamarias es de gran relevancia, ya que uno de los principales inconvenientes de la terapia con antibióticos tiene que ver con su administración con fines profilácticos para la prevención de la enfermedad durante el periodo de secado de los animales. Esta práctica favorece la selección de cepas resistentes en la población microbiana e influye negativamente en el tratamiento de la enfermedad. Es alta la posibilidad de que exista una transferencia horizontal de genes de resistencia entre microorganismos de igual o diferente género y especie, y que, a su vez, puedan infectar al ser humano a través de la cadena alimentaria; queda así plasmado que el uso inapropiado de antibióticos constituye un riesgo emergente, pues la resistencia a múltiples antibióticos no sólo se adquiere para antimicrobianos de la misma familia, sino también para drogas con diferentes mecanismos de acción y estructura química (Pellegrino *et al.*, 2011; Puig *et al.*, 2015).

Es así como en los últimos años se ha agregado un nuevo agravante al problema de la resistencia antimicrobiana con la aparición de reportes de casos de mastitis bovinas causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina, los SARM, que, si bien en un inicio fueron aislados principalmente desde hospitales, hoy en día se han extendido tanto a la comunidad como a las productoras de alimentos de origen animal (Kwon *et al.*, 2005; Camarena & Sánchez, 2014; Puig *et al.*, 2015). Aunque el término “resistencia a meticilina” incluye resistencia a derivados β -lactámicos, las cepas SARM presentan, en general, resistencia a varios grupos de antibióticos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cloranfenicol y macrólidos (Camarena & Sánchez, 2014).

A pesar de que el riesgo de propagación de SARM de origen bovino en la población humana es bajo mientras la leche no se consuma cruda, las personas que estén en estrecho contacto con el ganado infectado con SARM, incluidos los veterinarios, agricultores, ordeñadores y personas que trabajen en mataderos, pueden ser contagiados por estas bacterias (Juhász-Kaszanyitzky *et al.*, 2007).

Si bien la selección de agentes antimicrobianos para el uso terapéutico en la mastitis bovina se basa en pruebas de susceptibilidad de los patógenos de acuerdo con los estándares del “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”, este método mide la susceptibilidad sólo de bacterias planctónicas de rápido crecimiento, causando la errónea predicción de la cura bacteriológica en vacas infectadas, pues la evidencia científica indica que el tipo de **polisacáridos capsulares** que posea y la capacidad de *S. aureus* de formar **biofilm** e **invadir células** epiteliales mamarias bovinas permite su supervivencia, causando el fracaso terapéutico en vacas que sufren de mastitis persistentes causadas por *S. aureus*, independiente de su susceptibilidad antimicrobiana en ensayos *in vitro* (Cucarella *et al.*, 2004; Melchior *et al.*, 2007).

A pesar de que se han descrito varios mecanismos de resistencia antimicrobiana, muchos aspectos de la diseminación y persistencia de estas cepas en el ambiente siguen siendo inciertos (Beuron *et al.*, 2014).

2.2.2. Polisacáridos capsulares

Los polisacáridos capsulares (PC) son azúcares que forman parte de la pared bacteriana de *S. aureus* y que le confieren resistencia a la fagocitosis (O’Riordan & Lee, 2004; Salimena *et al.*, 2016). Esto permite mayor sobrevivencia de la bacteria y, por lo tanto, mayores posibilidades de diseminación. Además de conferir resistencia a la fagocitosis, la importancia de los PC radica en que entre el 94-100% de cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis son capsuladas (Guidry *et al.*, 1998).

Respecto a la serotipificación de cepas de *S. aureus* según el tipo de cápsula, se ha propuesto la existencia de 11 serotipos, sin embargo, solo se han aislado y caracterizado químicamente 4 de ellos (PC 1, 2, 5 y 8). Los PC1 y PC2 son de hallazgo infrecuente, mientras que los serotipos PC5 y PC8 han sido frecuentemente aislados de infecciones humanas y bovinas a nivel mundial (Guidry

et al., 1998; O’Riordan & Lee, 2004). En un estudio realizado por Guidry *et al.* (1997), en el que se evaluaron 273 cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis provenientes de cuatro importantes cuencas lecheras de EE. UU., el 59% resultó no tipificable, mientras que el 18% y el 23% presentaron serotipos 5 y 8, respectivamente. En un estudio posterior realizado por Tollersrud *et al.* (2000) que incluyó 636 cepas de *S. aureus* provenientes de Suecia, Islandia, Irlanda, Dinamarca, Finlandia y EE. UU., se determinó que, si bien existían diferencias entre países, la mayoría de las cepas europeas (63%) eran tipificables con antisueros contra los tipos PC5 o PC8, mientras que estos tipos capsulares se encontraron solo en un 42% de los aislados provenientes de EE. UU.

Respecto a la capacidad de formación de biofilm, a la capacidad de invasión celular y al tipo de PC, se ha observado que *S. aureus* modula la expresión de dichos factores de virulencia dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentre, es así que se ha observado que en la fase de crecimiento exponencial se expresan factores de virulencia que tienen que ver con la adherencia a un endotelio como son la formación de biofilm y la invasión celular, siendo la expresión de PC prácticamente nula (O’Riordan & Lee, 2004); a su vez, se ha observado que la ausencia de expresión de PC aumenta la invasión a células epiteliales mamarias bovinas (Thurlow *et al.*, 2011; Bardiau *et al.*, 2014). De modo contrario, cuando *S. aureus* se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento, disminuye la expresión de factores relacionados con la adherencia a epitelios, aumentando la expresión de PC (O’Riordan & Lee, 2004). Estos hallazgos sugieren que la modulación de la expresión de la cápsula puede ser uno de los mayores atributos de *S. aureus*, ya que mejoraría su capacidad de sobrevivir en una gran variedad de nichos ambientales (Pereyra, 2015).

2.2.3. Formación de Biofilm

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos autoproducida, y que se encuentran

adheridas a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton *et al.*, 1999; Fiadh, 2011). Esto ofrece a los microorganismos ventajas adaptativas como barrera fisiológica de protección frente a la respuesta inmune del hospedero y a las terapias antimicrobianas, lo que les permite establecerse como fuente continua de infección y contaminación (Jefferson, 2004; Abdallah *et al.*, 2014).

La formación de biofilms bacterianos se realiza en cuatro etapas consecutivas que comprenden la **adhesión** inicial a superficie, la **proliferación**, la **maduración** del biofilm, y el **desprendimiento o dispersión** de las bacterias para volver a una vida planctónica (Figura 1):

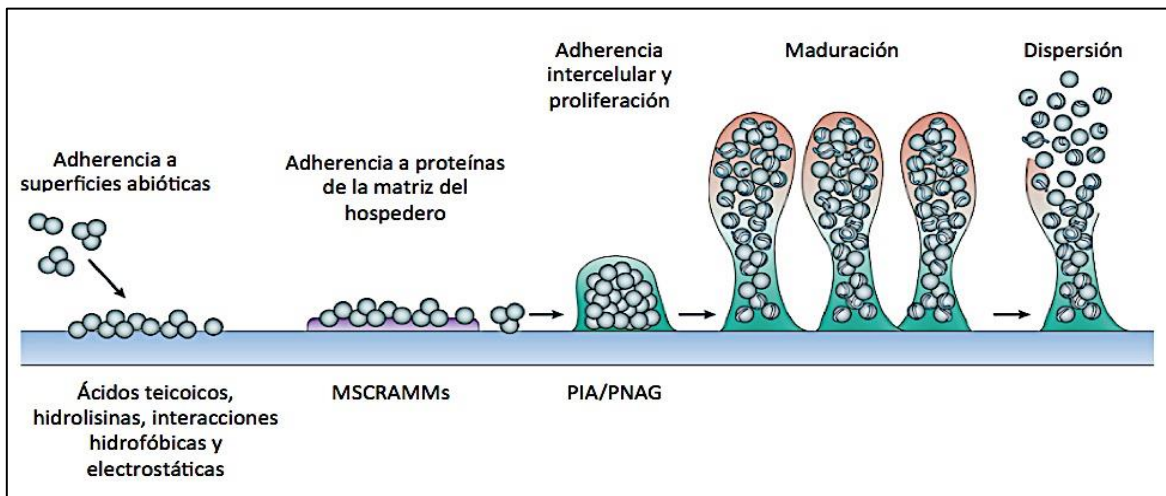


Figura 1. Formación de Biofilm de *Staphylococcus sp.* (adaptado de Otto, 2013).

La **adhesión** a superficies bióticas corresponde a una interacción entre componentes de la matriz extracelular de los tejidos y a la cualidad de adhesión del microorganismo (Otto, 2013; Foster *et al.*, 2014). *S. aureus* expresa una gran variedad de componentes de la pared celular bacteriana, conocidas como “adhesinas asociadas a la pared celular”, entre estas, los “Componentes de la Superficie Microbiana que Reconocen Moléculas Adhesivas de la Matriz” (MSCRAMM), fundamentales para la interacción del microorganismo con la matriz extracelular del hospedero. Entre estas MSCRAMMs, se encuentran las proteínas

de unión a fibronectina (FnBPs) (Cucarella *et al.*, 2004; Jefferson, 2004; Corrigan *et al.*, 2007; Atshan *et al.*, 2012; Otto, 2013; Foster *et al.*, 2014).

Las FnBPs juegan un rol fundamental en la patogénesis de la mastitis bovina debido a que son las proteínas que median la adherencia celular tanto para la formación de biofilm como para la invasión celular (Grundmeier *et al.*, 2004). Las FnBPs (FnBP-A y FnBP-B) son proteínas ancladas a la membrana de la pared celular de *S. aureus* codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB* respectivamente, y que tienen como función favorecer la unión específica de las bacterias a componentes de la matriz extracelular del hospedero, como lo es la fibronectina (Fn) (Castañón-Sánchez, 2012; Camussone & Calvihno, 2013). La Fn es una glicoproteína que forma parte de la matriz extracelular del hospedero y que cumple una función de “puente” entre las bacterias y el epitelio glandular mamario al permitir la unión de *S. aureus* con las integrinas ($\alpha 5$) $\beta 1$, receptoras de la fibronectina en las células epiteliales mamarias (Grundmeier *et al.*, 2004; Pereyra, 2015).

En cuanto a la fase de **proliferación** del biofilm, las células bacterianas se replican y producen un exopolisacárido llamado “polisacárido de adhesión intercelular” (PIA), también denominado poli-*N*-acetilglucosamina (PNAG), codificado por el operón *icaADBC* y que representa probablemente el componente más importante de la matriz extracelular en las especies de *Staphylococcus*, pues cepas de *S. aureus* productoras de PIA están a menudo relacionadas con infecciones de significancia (Arciola *et al.*, 2001; Otto, 2013).

Una vez producida la proliferación, el proceso de formación de biofilm se continúa con la **maduración**, donde las bacterias embebidas en el exopolisacárido adquieren la forma de una compleja arquitectura tridimensional canalizada (esencial para proporcionar nutrientes a las células de las capas más profundas del biofilm) (Dunne, 2002; Hwang-Soo & Otto, 2012; Periasamy *et al.*, 2012), y finalmente con la **dispersión**, donde las células bacterianas se desprenderán del biofilm en una

forma de vida planctónica, transformándose en fuente de contaminación de otras superficies (Melchior *et al.*, 2006).

Como ya se ha mencionado, las cepas de *S. aureus* que poseen el operón *icaADBC* son potencialmente productoras de biofilm y suelen ser relacionadas con infecciones de significancia, sin embargo, se ha reportado que cepas de *Staphylococcus* son capaces de formar biofilm en ausencia de PIA/PNAG (Hwang-Soo & Otto, 2012). En este caso, proteínas específicas reemplazan al exopolisacárido para la adhesión intercelular, entre estas, la “proteína asociada a biofilm”, Bap (Cucarella *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005; Lasa & Penadés, 2006; Otto, 2013).

La proteína Bap promueve la adhesión a superficies y la adhesión intercelular, a diferencia de PIA/PNAG, que está involucrado sólo en la adhesión intercelular (Cucarella *et al.* 2004; Lasa & Penadés, 2006). Es así que un ensayo realizado por Tormo *et al.* (2005), que tenía por objetivo determinar la necesidad del operón *icaADBC* en el proceso de formación de biofilm en cepas de SCN *bap-positivas*, observaron que Bap promovió la formación de biofilm en ausencia del exopolisacárido PIA/PNAG en las cepas de SCN ensayadas en superficies abióticas, lo que indicó que *bap* es capaz de mediar un mecanismo de formación de biofilm alternativo al mecanismo regular dependiente del operón *icaADBC*, lo cual también fue observado por otros investigadores como Cucarella *et al.* (2004). A su vez, Tormo *et al.* (2005) observaron en estudios *in vivo* posteriores que la presencia de Bap aumentó significativamente la capacidad de los microorganismos para colonizar y persistir en la glándula mamaria bovina.

En estudios realizados por Lasa & Penadés (2006), se observó que la disrupción del gen *bap* provocó una disminución en la acumulación de PIA/PNAG, provocando una menor formación de biofilm como consecuencia. Al realizar ensayos posteriores, se observó que la inactivación del operón *icaADBC* no tuvo ningún efecto sobre la formación *in vitro* de biofilm al utilizar cepas de *S. aureus*

bap-positivas. De acuerdo con estos resultados, el 100% de las cepas *bap*-positivas fueron productoras de biofilm fuertes, a pesar de que la mayoría de ellas no poseía el operón *icaADBC* (Lasa & Penadés, 2006).

Diversos investigadores han observado que animales naturalmente infectados con cepas de *S. aureus bap-positivas* presentan un menor recuento de células somáticas en la leche, lo que implica una menor inflamación en la glándula mamaria y, por lo tanto, una mayor capacidad de colonización de los microorganismos, lo cual se asociaría con la persistencia de estas infecciones en un hospedero inmunocompetente (Cucarella *et al.*, 2004; Thurlow *et al.*, 2011). Así mismo, se ha observado que cepas de *S. aureus bap-positivas* productoras de biofilm demuestran poseer menor susceptibilidad antimicrobiana en ensayos *in vitro* (Cucarella *et al.*, 2004).

En un estudio realizado por Salimena *et al.* (2016), se evaluó la formación de biofilm y se genotipificaron y fenotipificaron PCs de aislados de *S. aureus* desde vacas mastíticas de Brasil, con el fin de realizar una correlación entre ambos factores de virulencia. Se analizaron 159 aislados, observándose que aislados *cap5-positivos* produjeron menos cápsula o de menor densidad respecto a los aislados *cap8-positivos*, sin embargo, aislados *cap5-positivos* produjeron más biofilm respecto a los aislados *cap8-positivos*. De los 159 aislados analizados, el 100% contenían los genes *icaA* e *icaD*, mientras que 152 aislados contenían el gen *bap*. Al momento de comparar el genotipo y fenotipo capsular de los aislados con la formación de biofilm, se observó que más de la mitad de los aislados *cap5-positivos* y PC5 formaron biofilm fuerte, mientras que el 93,6% de aislados *cap8-positivos* y el 88% de los aislados PC8 formaron biofilm moderado o débil.

2.2.4. Invasión celular

Así como para la formación de biofilm, para la invasión celular es necesario que previamente se produzca una adhesión específica entre *S. aureus* y la célula

eucariota (Hensen *et al.*, 2000; Camussone & Calvihno, 2013). MSCRAMMs fundamentales para la adhesión y consecuente invasión de células epiteliales mamarias son las proteínas de unión a fibronectina, pues la patogénesis de la mastitis bovina estaría relacionada esencialmente con la expresión de dichas proteínas (Otto, 2013, Foster *et al.*, 2014). Las FnBPs se unirán a la Fn, seguida de la unión con las integrinas de las células del hospedero, lo que conducirá a la reorganización de la actina-F con la consecuente invasión de la célula hospedera por el desencadenamiento de señalizaciones intracelulares y el reordenamiento del citoesqueleto (Grundmeier *et al.*, 2004; Pereyra, 2015).

La importancia de las FnBPs radica en que son producidas por la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina; aparentemente no existirían diferencias en la actividad de unión a Fn entre las cepas que portan uno o ambos genes (*fnbA* o *fnbB*) (Ote *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2012).

En un estudio realizado por Brouillete *et al.* (2003), utilizaron un modelo de mastitis de ratón para evaluar una cepa de *S. aureus* mutante (carente de los genes *fnbA* y *fnbB*) y una cepa silvestre, observado que la cepa silvestre presentó mayor capacidad de colonizar las glándulas mamarias en comparación con la cepa mutante, aún bajo la presión ejercida por el amamantamiento, lo que indica que estas proteínas serían fundamentales en la patogénesis de la MB. De manera complementaria, se ha observado que en los estudios donde se han utilizado cepas mutantes de los genes *fnbA* y *fnbB*, la eficiencia en la invasión de células MAC-T se redujo en más del 95% respecto a cepas silvestres debido a la reducción de la adhesión, a pesar de que *S. aureus* posee la capacidad de codificar para otras adhesinas (Dziewanowska *et al.*, 1999).

Es así como, una vez producida la adhesión celular con su consecuente invasión, las bacterias podrán resistir tanto la acción de antibióticos como los

mecanismos de defensa del hospedero (Hensen *et al.*, 2000; Camussone & Calvihno, 2013).

Respecto a la invasión celular y su relación con la capacidad de formación de biofilm de las cepas, en un estudio realizado por Bardiau *et al.* (2014), correlacionaron diferentes propiedades de una colección de cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis, observando que aislados que mostraron una baja tasa de invasión celular no fueron capaces de formar biofilm o lo hicieron débilmente, mientras que los aislados que mostraron una alta tasa de invasión celular fueron capaces de producir biofilm en forma moderada o fuerte.

Adicionalmente Bardiau *et al.* (2016), estudiaron la asociación entre la invasión/supervivencia intracelular, la formación de biofilm y el grupo *agr* (tipificación) de cepas de *S. aureus*, observándose que las cepas *cap8-positivas/PC8* obtuvieron bajas tasas de invasión celular y pertenecieron mayoritariamente al grupo II-*agr*, mientras que las cepas *cap5-positivas/NT* o *cap5-positivas/PC5* obtuvieron mayores tasas de invasión celular y pertenecieron mayoritariamente al grupo I-*agr*, no se pudo observar ninguna asociación entre la formación de biofilm y el resto de los factores de virulencia.

Por lo tanto, es necesario investigar si cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes poseen mayor capacidad *in vitro* de formar biofilm y de invadir células epiteliales mamarias que aquellos aislados que provienen de vacas con mastitis transitorias, ya que dichos procesos estarían directamente relacionados con la evasión del tratamiento antibiótico y del sistema inmune y, por tanto, con la capacidad de persistencia de las bacterias en la glándula mamaria.

3. HIPÓTESIS

Cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes poseen mayor capacidad *in vitro* de formar biofilm y de invadir células epiteliales mamarias, a diferencia de cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis transitorias.

4. OBJETIVOS

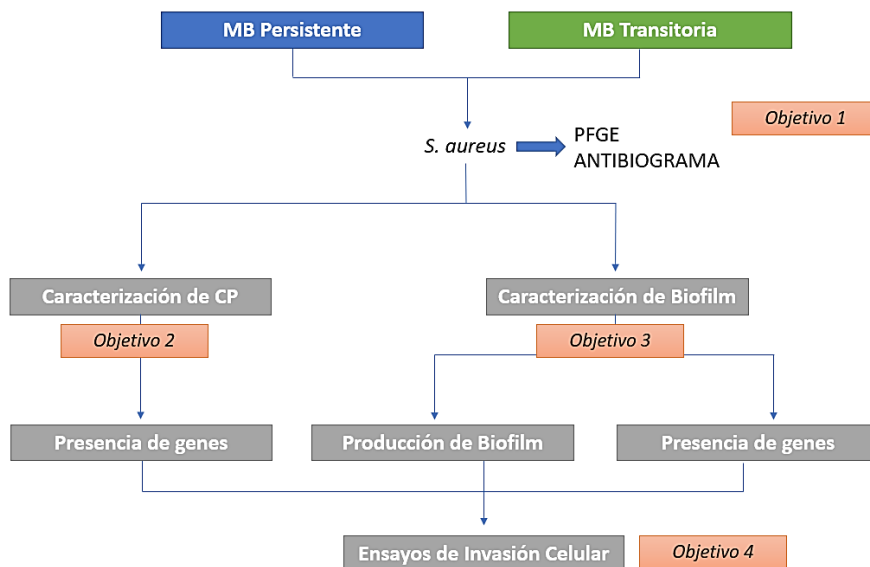
4.1. Objetivo general

Determinar diferencias entre cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes y de vacas con mastitis transitorias, respecto a su capacidad *in vitro* de formación de biofilm e invasión celular y a su genotipificación capsular.

4.2. Objetivos específicos

1. Tipificar y caracterizar aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes y transitorias mediante PFGE y resistencia antimicrobiana.
2. Determinar la presencia de los genes *cap5* y *cap8* en el genoma de cepas de *S. aureus* según su procedencia.
3. Evaluar la capacidad de formación de biofilm de cepas de *S. aureus* y la presencia de genes relacionados con dicho factor de virulencia según la procedencia de las cepas.
4. Evaluar la capacidad de invasión celular de cepas de *S. aureus* según su procedencia.

5. METODOLOGÍA



5.1. Colección de aislados de *S. aureus*

En el laboratorio de Microbiología y Probióticos del INTA, se dispone de una colección de aislados de *S. aureus* (n=545) obtenidos entre los años 2014 y 2015 desde muestras de leche de vacas con mastitis, de distintas lecherías del centro y sur del país. Las muestras de leche fueron tomadas desde las mismas vacas con una periodicidad de una vez al mes en el contexto del proyecto FIA PYT-2013-0030, siendo analizadas microbiológicamente además de determinar su RCS.

5.2. Preselección de aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistente y de vacas con mastitis transitorias

Se consideraron en el estudio aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis según información obtenida del proyecto FIA PYT-2013-0030: se seleccionaron a) aislados de *S. aureus* que provenían de vacas con mastitis persistentes, es decir, de vacas que hayan presentado mastitis por un mínimo de 4 meses de manera continua y b) aislados de *S. aureus* que provenían de vacas que, durante en el mismo periodo de tiempo, presentaron sólo una vez mastitis o que

presentaron mastitis no continuas (mastitis transitoria). La identidad de *S. aureus*, previamente identificado mediante pruebas bioquímicas, fue confirmada por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) específico.

5.3. Análisis de PCR de *S. aureus*

Para determinar que los aislados preseleccionados correspondían a *S. aureus*, se realizó PCR del gen *nuc*, el cual codifica para una nucleasa termoestable. Los partidores que se utilizaron fueron los descritos por Gandra *et al.* 2011 (F 5'-ATG AAG TCA AAT AAA TCG CT-3'; R 5'-TTT GGT GAA AAA TAC TTC TC-3'). La obtención del ADN genómico bacteriano se realizó con el Kit Genomic DNA Purification (Promega), con una incubación previa de 1 hora a 60°C con lisostafina (1 mg/mL). La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 20 µL de mezcla. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento de los primers a 53°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos. El análisis del tamaño de la banda (458 pb) se realizó mediante electroforesis en agarosa al 1% teñido con gel red (Biotium). Como control positivo, se utilizó el ADN de la cepa de *S. aureus* ATTC 29213, mientras que como control negativo se utilizó el ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Se debe destacar que se requiere de un nivel 2 de bioseguridad en el laboratorio para trabajar con cepas de *S. aureus* (Organización Mundial de la Salud, 2005).

5.4. Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Se realizó PFGE con la finalidad de evaluar la diversidad genética de los aislados de *S. aureus* preseleccionados. Para esto, se usó la metodología descrita por McDougal *et al.* (2003) con algunas modificaciones, pues se utilizó la

endopeptidasa lisostafina en una concentración de 1 mg/mL (Sigma Aldrich) (Bastos *et al.*, 2010) para la lisis de *S. aureus*.

Brevemente, para la inclusión de *S. aureus* en plugs de agarosa, se sembraron las cepas en agar sangre cordero a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se prepararon suspensiones de los aislados en buffer SA (10mM Tris-HCl pH 7.2, 20mM NaCl, 50mM EDTA) a una DO_{600nm} (densidad óptica a 600 nm) entre 0,8 y 1,0. Se agregaron 5 µL de lisostafina (1 mg/mL) en 300 µL de la suspensión ajustada y se incubaron a 37°C por 10 minutos. Luego, se añadieron 300 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Bio-Rad) al 1% y se colocó la suspensión en un molde para formar los plugs de agarosa.

Para la lisis de la pared celular bacteriana, se traspasaron los plugs a tubos con 2 mL de buffer de lisis ST (10mM Tris-HCl pH 7.2, 50mM NaCl, 50mM EDTA, 0,2% Deoxicolato, 0,5% N-Laurilsarcosina) y 15 µL de lisozima (10 mg/mL). Los tubos se incubaron a 37°C por 2 horas. Luego, se lavaron los plugs con agua destilada desionizada (agua DD) previamente calentada a 54°C; luego del lavado, se agregó a cada tubo 2,5 mL de buffer de lisis CLB (50mM Tris, 50 mM EDTA pH 8, 1% Sarcosyl) y 24 µL de Proteinasa K (20 mg/mL). Los tubos se incubaron a 54°C por 2 horas con agitación constante. El lavado de los plugs de agarosa se hizo con agua DD previamente calentada a 54°C, 3 veces durante 15 minutos con agitación constante. Luego, los plugs se lavaron una vez con buffer TE (10mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA) previamente calentando a 54°C, cumpliendo las mismas condiciones de lavado.

Para la digestión con enzima de restricción, se utilizaron las enzimas *Sma* I (Thermofisher) y *Xba* I (Thermofisher) para *S. aureus* y para *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 respectivamente; esta última cepa se utilizó como estándar de tamaño molecular. Se utilizaron un tercio de los plugs, los cuales se ambientaron previamente en 200 µL de un mix de pre-restricción (20 µL Buffer Tango10X y 180 µL de agua estéril libre de nucleasas) para luego ser incubados a

37°C durante 15 minutos. Una vez retirado el buffer de pre-restricción, cada plug se sometió a restricción enzimática en un volumen final de 200 µL de mix de restricción: 2 µL de Enzima *Sma I/Xba I* (10U/µL), 20 µL de Buffer tango (10X) y 178 µL de agua estéril libre de nucleasas. Las mezclas se incubaron a 30°C y 37°C respectivamente, durante 4 horas.

El gel de corrida fue preparado con agarosa de bajo punto de fusión, en buffer TBE 0,5% (1M Tris pH 8, 0,01 M EDTA, 0,9M ácido bórico). El gel fue preparado al 1%. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: tiempo de corrida (19 horas), tiempo de pulso inicial (5,3 segundos), tiempo de pulso final (34,9 segundos), voltaje: 6 V/cm, ángulo de corrida de 120° y temperatura de 14°C.

En cuanto a los análisis de perfiles de restricción, se analizaron con el programa computacional Gel Compar II (Bionumerics 7,1 1998-2013 Applied Maths). La normalización de la imagen se realizó de acuerdo con el perfil de restricción de la cepa estándar *S. enterica* serovar Braenderup H9812. El dendograma se obtuvo con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) con un coeficiente de Dice de 1,0% de tolerancia para así definir grupos sobre el 90% de similitud genética.

5.5. Ensayos de resistencia antimicrobiana

- **Prueba de difusión en discos de Kirby-Buer:**

Los aislados fueron caracterizados de acuerdo con su perfil de resistencia antimicrobiana. Se evaluaron los antibióticos ampicilina, amoxicilina, estreptomycin, eritromicina, lincomicina y clindamicina por ser utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina causada por múltiples agentes bacterianos, mientras que los antibióticos cefoxitin, gentamicina, amikacina, kanamicina, sulfatrimetoprim y ciprofloxacino se evaluaron por importancia a nivel de salud pública.

Los ensayos de resistencia antimicrobiana se realizaron mediante la prueba de difusión en discos de Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones del CLSI M100S (2016) y del CLSI M2-A10 (2010). *S. aureus* ATTC 25923 fue utilizada como cepa control. El ensayo fue realizado por duplicado.

Adicionalmente, se evaluó la resistencia a meticilina mediante la detección del gen *mecA* por PCR. Los partidores que se utilizaron fueron los descritos por Murakami *et al.* (1991). Como control positivo se utilizó el ADN de la cepa de *S. aureus* ATCC 129 (muestra clínica), mientras que como control negativo se utilizó el ADN de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

- **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):**

La CIM se realizó mediante el método de dilución en agar según los estándares del CLSI VET06 (2017), y los puntos de corte se definieron según los estándares del CLSI VET01S (2015). Con el fin de evaluar resistencia a la meticilina, se utilizó oxacilina como antimicrobiano indicador.

Previo al ensayo, la oxacilina (95% de potencia) se diluyó con agua destilada estéril en un rango de concentraciones entre 0,125 µg/mL y 512 µg/mL, mientras que para la preparación de las placas se utilizó agar Müeller-Hinton suplementado con 2% peso/volumen de NaCl como medio de cultivo; el medio de cultivo fue suplementado con el antimicrobiano diluido hasta alcanzar las concentraciones requeridas (proporción 1:10).

Los inóculos de *S. aureus* fueron ajustados a 0,5 McFarland en suero fisiológico, para luego ser colocados en un Replicador de Steers para realizar la impresión de las placas, comenzando con las placas control (placas de agar sin antimicrobiano), seguidas por las placas de menor a mayor concentración antimicrobiana. Las placas impresas fueron incubadas a 35°C durante 24 horas para

posterior lectura. La CIM fue definida como la menor concentración del antimicrobiano donde no se observó proliferación bacteriana. Se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 como cepa control. Las cepas de *S. aureus* fueron consideradas como sensibles a la meticilina en una CIM ≤ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El ensayo fue realizado por duplicado.

5.6. Genotipificación capsular de *S. aureus*

Se realizó PCR de los genes *cap5* y *cap8* con el fin de identificar su presencia en el genoma de los aislados de *S. aureus*. Los partidores utilizados para la identificación de *cap5* fueron los descritos por Verdier *et al.* (2007) (Tabla 1), y para la identificación de *cap8* fueron los descritos por Kumar *et al.* (2011) (Tabla 1). Como control positivo del gen *cap5*, se utilizó el ADN de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, y como control positivo del gen *cap8* se utilizó el ADN de la cepa de *S. aureus* aislada de campo, positiva para este gen.

Tabla 1. Descripción de los partidores utilizados para la identificación de los genes *cap5* y *cap8* en el genoma de aislados de *S. aureus*.

Gen	Secuencia de los partidores (5' - 3')	Referencia
<i>cap5</i>	F: GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG	Verdier <i>et al.</i> 2007
	R: ACTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG	
<i>cap8</i>	F: ATGACGATGAGGATAGCG	Kumar <i>et al.</i> 2011
	R: CACCTAACATAAGGCAAG	

5.7. Ensayos de formación de biofilm de *S. aureus* en microplaca de 96 pocillos

Para las cepas seleccionadas según su tipificación y caracterización, se evaluó la capacidad de formar biofilm en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, con tinción de Cristal Violeta 0,5%. Se empleó el medio de cultivo Caldo tripticosa-soya (Tryptic Soy Broth, TSB) + Lactosa al 4,8%.

Los ensayos de formación de biofilm se realizaron según el método descrito por Darwish & Asfour, 2013: Los inóculos a evaluar fueron distribuidos por triplicado en alícuotas de 200 μ L. Se utilizó la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 como control positivo. Los controles blancos del ensayo se realizaron igualmente por triplicado, depositando alícuotas de 200 μ L de medio TSB + Lactosa 4,8%.

La placa se incubó a 37°C durante 24 horas. Luego, se removió el contenido de cada pocillo por aspiración y se lavó con solución salina estéril. Las bacterias adheridas se tiñeron con solución acuosa de cristal violeta al 0,5%. Luego, las placas fueron lavadas con agua destilada hasta que no se observó colorante en el agua de lavado. Posteriormente, a cada pocillo se agregó etanol al 95% para disolver la tinción de las bacterias adheridas. La lectura de las placas se realizó en lector de placas de microtitulación a una densidad óptica de 570 nm (DO_{570}). La DO de cada aislado se determinó promediando las lecturas de los tres pocillos. La capacidad de formación de biofilm de los aislados estudiados fue clasificada en cuatro categorías: No formación ($DO < DOc$), formación débil ($DOc < DO < 2 \times DOc$), formación moderada ($2 \times DOc < DO < 4 \times DOc$), formación fuerte ($4 \times DOc < DO$) (Darwish & Asfour, 2013).

Los ensayos se realizaron tres veces en diferentes días, por triplicado.

Además, se realizó PCR del operón *icaADBC* y del gen *bap* con el fin de relacionar la formación de biofilm con la presencia de dichos genes en el genoma de las bacterias. Los partidores que se utilizaron para el operón *icaADBC* fueron diseñados en nuestro laboratorio (Tesis Zúñiga, 2016) (control positivo: *S. aureus* ATCC 29213) (Tabla 2), así como también los partidores utilizados para el gen *bap* (Tesis Zúñiga, 2016) (control positivo: *S. aureus* ATCC 29213) (Tabla 2). Además, se realizó PCR de los genes *fnbA* y *fnbB* con el fin de relacionar la capacidad de invasión celular con la presencia de dichos genes en el genoma de las cepas. Los partidores que se utilizaron para el gen *fnbA* (control positivo: *S. aureus* ATCC

29213) y para el gen *fnbB* (control positivo: *S. aureus* ATCC 29213) fueron diseñados en nuestro laboratorio para esta tesis (Tabla 2):

Tabla 2. Descripción de los partidores utilizados para la identificación de los genes del operón *icaADBC*, del gen *bap* y de los genes *fnbA* y *fnbB* en el genoma de aislados de *S. aureus*.

Gen	Secuencia de los partidores (5' - 3')	Referencia
<i>icaA</i>	F: ACGTTGGCTACTGGGATACT	Tesis Zúñiga, 2016
	R: ATGGCAAGCGGTTTCATACTT	
<i>icaD</i>	F: TCGCTATATCTTTGTCTTTTGGGA	Tesis Zúñiga, 2016
	R: ATCGCGAAAATGCCCATAGT	
<i>icaB</i>	F: AAATACCGGCAACTGGGTTT	Tesis Zúñiga, 2016
	R: TGCAAATCGTGGGTATGTGT	
<i>icaC</i>	F: GGAGGGTGGATCCTTAGTGT	Tesis Zúñiga, 2016
	R: ACTTTTTGGTAATTCAAGGTTGTCA	
<i>bap</i>	F: GGACTCGGATGCAGGAAAAC	Tesis Zúñiga, 2016
	R: TGCGACGACCGAATAACAAT	
<i>fnbA</i>	F: CTCGACTGGTCCTTGTGCTT	Tesis Helen Navea, 2018
	R: TGGATAGCGAAGCAGGTCAC	
<i>fnbB</i>	F: GCTGCAGCATCGGAACAAA	Tesis Helen Navea, 2018
	R: TGCTTGACAGTTTTCGGTG	

5.8. Ensayos de invasión de *S. aureus* en células MAC-T

Para realizar los ensayos de invasión celular, se seleccionaron cepas de acuerdo con los resultados de los ensayos ya descritos y en base a la frecuencia de detección de los genes *fnbA* y *fnbB* en el genoma de las cepas; los ensayos se llevaron a cabo con la línea celular MAC-T (del inglés “Mammary Alveolar Cells-large T antigen”), en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

El ensayo de invasión celular se realizó siguiendo la metodología de Almeida *et al.* (1996). El ensayo se basó en la incubación de las cepas de *S. aureus* seleccionadas con las células MAC-T, continuando con la eliminación selectiva de

las bacterias extracelulares por la adición de gentamicina, y finalizando con la liberación de las bacterias internalizadas mediante lisis de las células eucariotas.

La incubación bacteria/células se realizó en placas de 24 pocillos, y se utilizó una relación 100:1 (MOI100); se utilizó un inóculo bacteriano inicial de aproximadamente 3×10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colonias/mL). Los cultivos se incubaron durante 2 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Paralelamente, se determinó la concentración bacteriana inicial mediante siembra de los inóculos bacterianos en placas de agar manitol salado (en duplicado).

Pasadas las dos horas de incubación, los sobrenadantes fueron eliminados y las monocapas celulares fueron lavadas 3 veces con PBS, para luego ser tratadas con gentamicina (300 µg/mL) e incubadas durante 2 horas más a 37°C con 5% de CO₂. Luego, los sobrenadantes fueron recolectados y sembrados en placas de agar manitol para verificar muerte bacteriana.

Por último, las monocapas celulares fueron lavadas 3 veces con PBS para luego ser lisadas con Tritón X-100 (0,05%) durante 10 min/150 rpm (revoluciones por minuto) a temperatura ambiente, para la liberación de las bacterias internalizadas; se realizó recuento de UFC de dichas bacterias en placas de agar manitol salado.

La invasión se expresó como Log₁₀ de UFC recuperadas/mL luego de la lisis de células MAC-T.

Como control negativo del ensayo de invasión celular, se utilizó la cepa *E. coli* DH5α.

Los ensayos fueron realizados tres veces en diferentes días, por duplicado, en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

5.9. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre los grupos de cepas que provenían de vacas con MP y de vacas con MT respecto a la capacidad *in vitro* de formación de biofilm y de invasión celular, se realizó una prueba de T-test a partir de los Log10 de los datos, con un nivel de significancia de $P\text{-value} < 0,05$. Para probar la normalidad y homogeneidad de los datos, se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Fligner-Killeen respectivamente ($P\text{-value} > 0,05$). En el caso de que los datos no fuesen normales y/u homogéneos, se realizaría una prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Para las variables “formación de biofilm” e “invasión celular”, se realizó un análisis de correlación de Pearson a partir de los Log10 de los datos.

Se utilizó el programa estadístico “R”.

6.- RESULTADOS

6.1. Preselección de aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistente (MP) y de vacas con mastitis transitoria (MT).

Para llevar a cabo el presente estudio, fue necesario seleccionar cepas representativas de mastitis persistentes y mastitis transitorias. De un total de 545 aislados de *S. aureus* obtenidos en el marco de un proyecto FIA PYT-2013-0030, se analizó su origen y frecuencia de aislamiento. A partir de esta información, se realizó una preselección de 26 aislados de *S. aureus* que provenían de vacas que presentaron mastitis por un mínimo de 4 meses consecutivos (cepas de mastitis persistente, MP) y de 4 aislados de *S. aureus* que provenían de vacas que, durante el mismo periodo de tiempo, presentaron sólo una vez mastitis o que presentaron mastitis no continuas (cepas de mastitis transitoria, MT) (Tabla 3):

Tabla 3. Origen de los aislados de *S. aureus* preseleccionados para el estudio.

VACA	MASTITIS	CÓDIGO AISLADO	Nº AISLADO	ZONA	FECHA MUESTREO
2102	Persistente	MTI-0040-01	25	Centro	abr-14
		MTI-328-01	30	Centro	jun-14
		MTI-466-01	31	Centro	jul-14
		MTI-547-01	6	Centro	ago-14
		MTI-760-02	14	Centro	oct-14
		MTI-883-01	19	Centro	nov-14
		MTI-1070-01	5	Centro	dic-14
		MTI-1250-02	21	Centro	feb-15
		MTI-1262-01	28	Centro	mar-15
HUERTA	Persistente	MTI-27-C4-01	3	Centro	abr-14
		MTI-155-01	35	Centro	may-14
		MTI-284-01	36	Centro	jun-14
		MTI-436-01	1	Centro	jul-14
6210	Persistente	MTI-1058-03	26	Centro	dic-14
		MTI-1200-02	24	Centro	ene-15

		MTI-1229-01	2	Centro	feb-15
		MTI-1315-01	13	Centro	mar-15
6216	Persistente	MTI-901-01	7	Centro	nov-14
		MTI-1061-01	12	Centro	dic-14
		MTI-1225-01	20	Centro	feb-15
		MTI-1309-01	16	Centro	mar-15
1473	Persistente	MTI-498-01	34	Sur	jul-14
		MTI-709-01	32	Sur	sep-14
		MTI-806-01	27	Sur	oct-14
		MTI-946-02	10	Sur	nov-14
		MTI-1132-02	17	Sur	dic-14
1777	Transitoria	MTI-499-01	37	Sur	jul-14
917	Transitoria	MTI-808-01	39	Sur	oct-14
4955	Transitoria	MTI-454-01	42	Centro	jul-14
7877	Transitoria	MTI-1226-01	45	Centro	feb-15

La identidad de los 30 aislados de *S. aureus*, previamente identificados mediante pruebas bioquímicas (agar manitol salado, prueba de la coagulasa, prueba de Voges Proskauer), fue confirmada mediante la detección del gen *nuc* por técnica de PCR. El resultado del PCR coincidió con los resultados de las pruebas bioquímicas, confirmando que los 30 aislados resultaron ser de la especie *S. aureus* (Tabla 4):

Tabla 4. Pruebas confirmatorias para la identificación de aislados de *S. aureus*.

N° AISLADO	PRUEBAS FENOTÍPICAS			ANÁLISIS GENÉTICO
	AGAR MANITOL SALADO	PRUEBA DE LA COAGULASA	VOGES PROSKAUER	PCR <i>nuc</i>
25	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+
6	+	+	+	+
14	+	+	+	+
19	+	+	+	+
5	+	+	+	+
21	+	+	+	+
28	+	+	+	+
3	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	+
1	+	+	+	+
26	+	+	+	+
24	+	+	+	+
2	+	+	+	+
13	+	+	+	+
7	+	+	+	+
12	+	+	+	+
20	+	+	+	+
16	+	+	+	+
34	+	+	+	+
32	+	+	+	+
27	+	+	+	+
10	+	+	+	+
17	+	+	+	+
37	+	+	+	+
39	+	+	+	+
42	+	+	+	+
45	+	+	+	+

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos de este estudio.

6.2. Caracterización y tipificación de aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes y transitorias mediante pruebas de resistencia antimicrobiana y PFGE.

Los 30 aislados seleccionados fueron caracterizados mediante pruebas de resistencia antimicrobiana (antibiograma) y detección del gen *mecA* por PCR para la detección de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM). Para los antibiogramas, se utilizaron los 12 antibióticos ya mencionados en la sección de metodología.

Los 30 aislados resultaron ser sensibles a los doce antibióticos probados, a excepción del aislado 42 (cepa de MT), el cual resultó ser resistente a la lincomicina (1/30, 3,3%) (figura 2). Respecto al gen *mecA*, no se detectó su presencia en el genoma de ninguno de los 30 aislados.

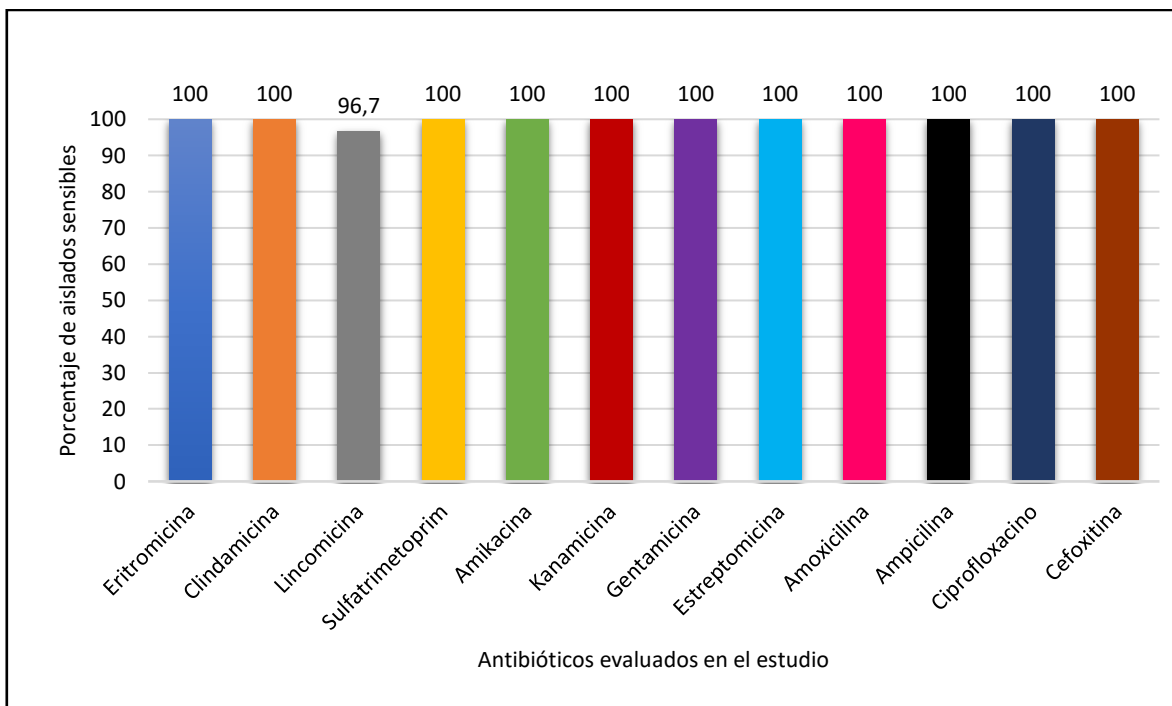


Figura 2. Frecuencia de sensibilidad antimicrobiana de los 30 aislados de *S. aureus* según los 12 antibióticos evaluados.

Luego, los 30 aislados fueron tipificados mediante PFGE para evaluar el grado de clonalidad entre ellos. Se lograron identificar 15 pulsotipos (15 cepas totales), los cuales fueron definidos con una identidad $\geq 90\%$ entre los aislados. El análisis del PFGE reveló que los aislados que provenían de una misma vaca con MP presentaron alto porcentaje de clonalidad ($\geq 90\%$). Solo para las vacas “2102”, “6210” y “1473” de MP se identificó uno de los aislados con un perfil genético diferente. Los aislados provenientes de vacas con MT (vacas “1777”, “917”, “4955” y “7877”) no presentaron relación clonal con ningún otro aislado (figura 3):

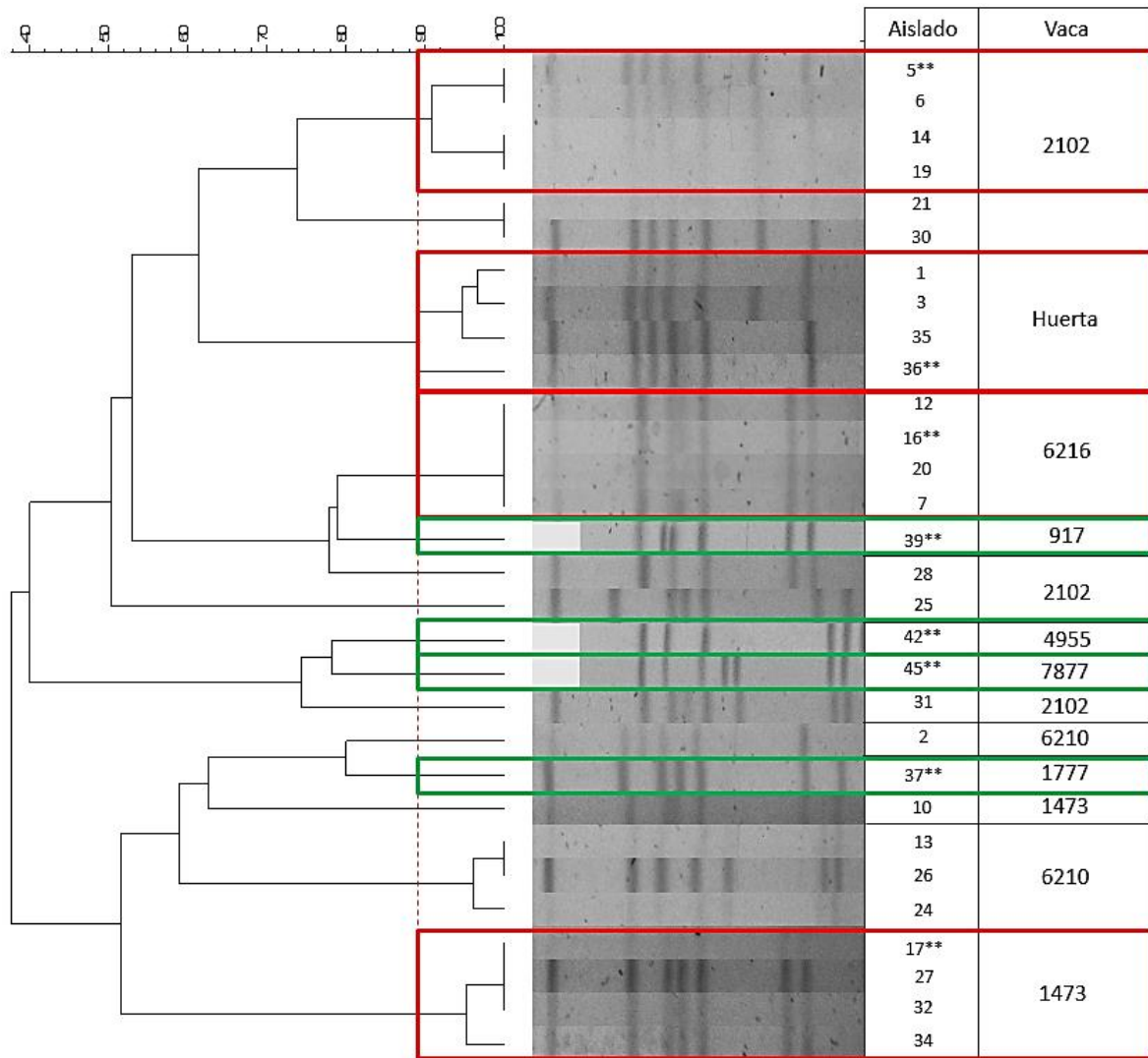


Figura 3. Distribución de los aislados de *S. aureus* en base a su similitud genética determinada mediante PFGE. Los cuadros rojos representan a las cepas provenientes de vacas con MP y los cuadros verdes representan a las cepas provenientes de vacas con MT. **: Aislados seleccionados como representantes de cada pulsotipo. Las bandas horizontales muestran un patrón característico de restricción del material genético de un aislado de *S. aureus*. La comparación de la posición de estas bandas entre los aislados permite estimar su similitud. A la izquierda de la figura, se presenta un dendrograma, en el cual en cada nodo (bifurcación) se registra la similitud entre los aislados; >90% se clasifica como una misma cepa.

La información obtenida del análisis del PFGE permitió identificar 8 pulsotipos (4 de MP y 4 MT) que fueron seleccionados para los ensayos posteriores, pues de acuerdo con los criterios de inclusión, se requiere de un mínimo de 4 aislados clones

obtenidos por al menos 4 meses consecutivos para definir cepas de mastitis persistente.

A partir de la información obtenida de los ensayos de PFGE y dado que los perfiles de susceptibilidad a antibióticos resultaron ser similares entre cepas de un mismo pulsotipo, se seleccionaron al azar aislados representantes de cada pulsotipo para los próximos ensayos. Por lo tanto, los grupos de estudio se conformaron por 4 cepas de MP (cepas 5, 16, 17, 36) y 4 de MT (cepas 37, 39, 42 y 45).

Adicionalmente, a estas 8 cepas de *S. aureus* se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para oxacilina. Todas las cepas presentaron una CIM de 0,5 µg/mL, a excepción de la cepa 16 (cepa proveniente de MP), la cual presentó una CIM de 1 µg/mL. Según estos valores, todas las cepas fueron clasificadas como cepas sensibles a oxacilina, lo que coincide con los resultados de los ensayos de PCR para el gen *mecA*.

6.3. Determinación de la presencia de los genes *cap5* y *cap8* en el genoma de cepas de *S. aureus* procedentes de mastitis persistentes y de mastitis transitorias.

Se identificó la presencia de los genes *cap5* y *cap8* en el genoma de las 8 cepas de *S. aureus* mediante PCR.

De las 4 cepas provenientes de vacas con MP, las 4 (100%) codificaron para el gen *cap5*, mientras que, de las 4 cepas provenientes de vacas con MT, 1 (25%) codificó para el gen *cap5* y en las tres restantes no fue posible detectar ni el gen *cap5* ni *cap8*, por lo que fueron clasificadas como “no tipificables” (figura 4):

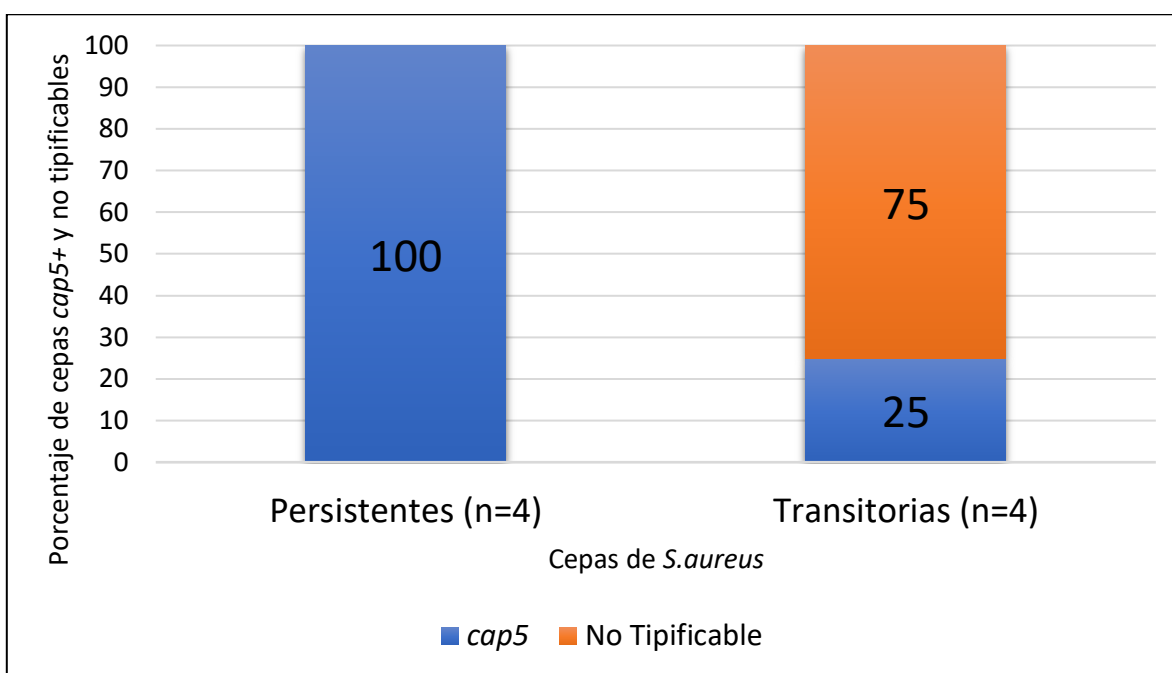


Figura 4. Caracterización de cepas de *S. aureus* provenientes de MP y MT, según su genotipificación capsular.

6.4. Evaluación de la capacidad de formación de biofilm de cepas de *S. aureus* y determinación de la presencia de genes relacionados

Se evaluó la capacidad de formación de biofilm *in vitro* de las cepas seleccionadas en medio de cultivo suplementado con lactosa (4,8%), ya que se ha observado que tanto el uso de leche como medio de cultivo como también la adición de lactosa en diversas concentraciones, aumenta la capacidad de producción de biofilm de aislados de *S. aureus* (Xue *et al.*, 2014).

Se observó que el 100% de las cepas (n=8) fueron capaces de producir biofilm. De las 8 cepas, 6 (75%) formaron biofilm de manera fuerte y 2 (25%) formaron biofilm de manera moderada. Al analizar la producción de biofilm respecto al origen de las cepas, se observó que las 4 cepas (100%) provenientes de vacas con MP formaron biofilm de manera fuerte, mientras que, de las 4 cepas provenientes de vacas con MT, 2 (50%) formaron biofilm de manera fuerte y 2 (50%) formaron biofilm de manera moderada (figura 5):

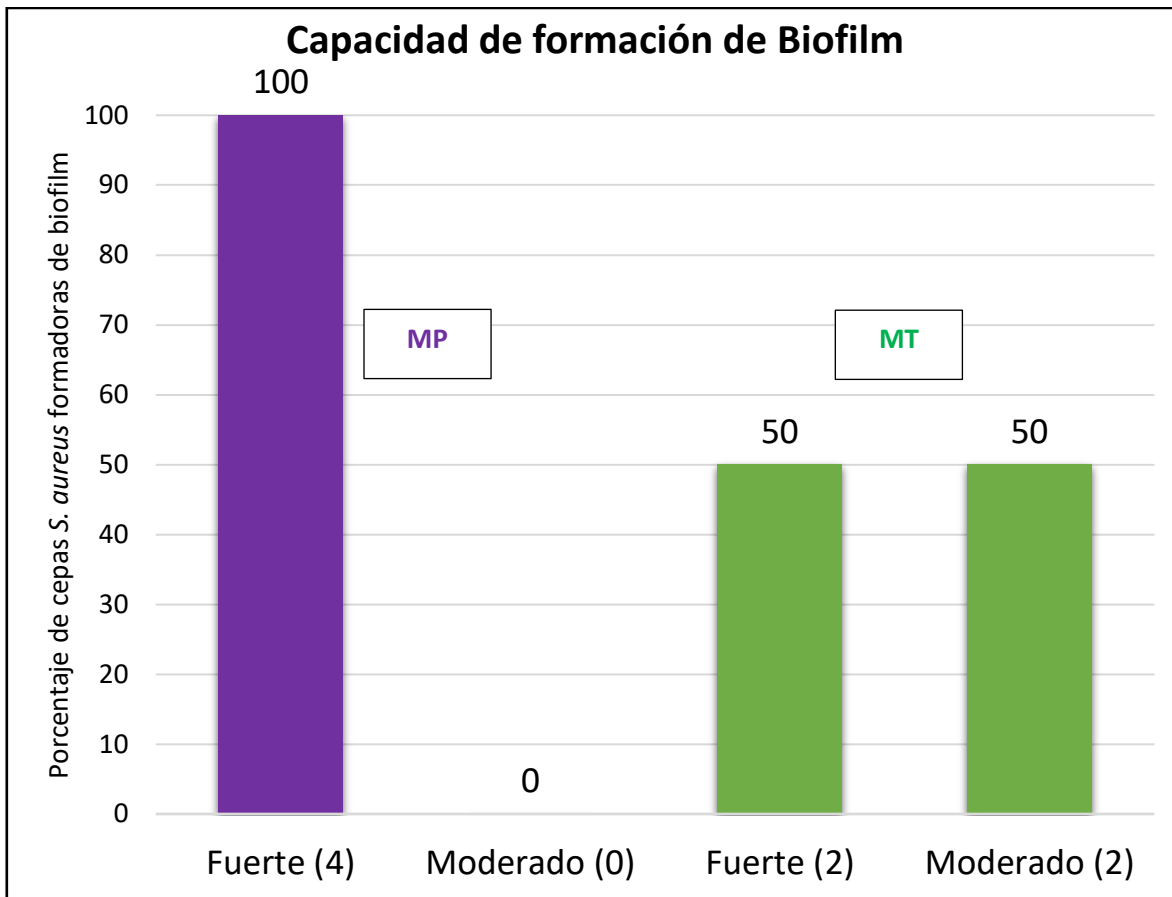


Figura 5. Distribución de las cepas de *S. aureus* (n=8) de acuerdo con su capacidad de formación de biofilm y su origen. MP: cepas provenientes de vacas con mastitis persistente; MT: cepas provenientes de vacas con mastitis transitoria.

Respecto a la cantidad de biofilm producido *in vitro*, ya que los datos tuvieron una distribución normal ($P\text{-value} > 0,05$) y fueron homogéneos ($P\text{-value} > 0,05$), se realizó una prueba de T-test con tal de evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de cepas según su origen (MP o MT) respecto a la cantidad de biofilm producido *in vitro*. Se observó que la cantidad de biofilm producido es dependiente del origen de las cepas ($P\text{-value} = 0,04705$), siendo las cepas de origen MP las que producen una mayor cantidad de biofilm (figura 6):

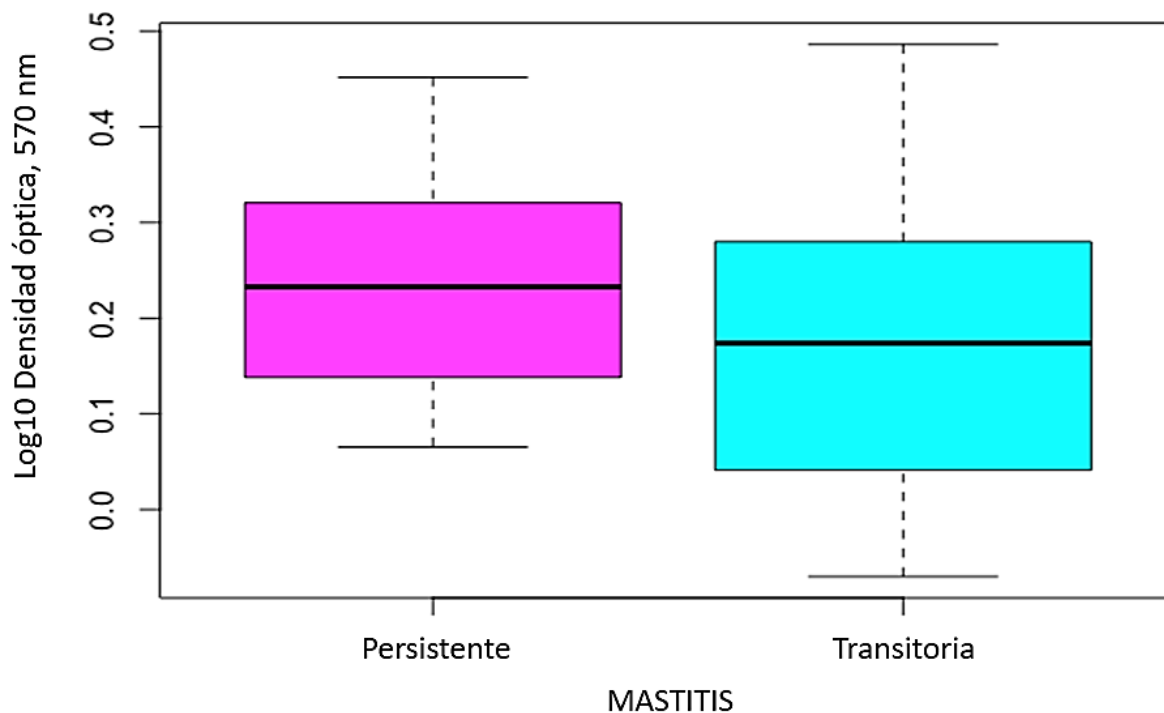


Figura 6. Comparación entre grupos de cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con MP y de vacas con MT respecto a su producción *in vitro* de biofilm. *P-value* = 0,04705. n = 8. T-test.

Posteriormente, se analizó la presencia de los genes que codifican para proteínas relacionadas con la formación de biofilm en el genoma de las 8 cepas de *S. aureus*. Mediante técnica de PCR, se detectaron aquellos genes que forman parte del operón *icaADBC* y los genes *bap*, *fnbA* y *fnbB*. Los resultados mostraron que las 4 cepas provenientes de vacas con MP y las 4 cepas provenientes de vacas con MT poseían los genes del operón *icaADBC* y los genes *bap*, *fnbA* y *fnbB* en su genoma (Tabla 5):

Tabla 5. Características genómicas y de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio.

Aislado	Mastitis	<i>mecA</i>	Antibiograma*	<i>cap5</i>	<i>cap8</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>bap</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>
36	MP	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+
17	MP	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5	MP	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+
16	MP	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+
37	MT	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+
39	MT	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+
42	MT	-	Lincomicina-R	-	-	+	+	+	+	+	+	+
45	MT	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+

* Antibióticos utilizados en el estudio para la realización de antibiogramas: Eritromicina, clindamicina, lincomicina, sulfatrimetoprim, amikacina, kanamicina, gentamicina, estreptomicina, amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacino y cefoxitina. S: Sensible a los 12 antibióticos probados. Lincomicina-R: Resistente a lincomicina.

6.5. Evaluación de la capacidad de invasión celular de cepas de *S. aureus* según su procedencia

La capacidad de invasión celular de cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes fue evaluada mediante ensayos de invasión de células epiteliales MAC-T después de 2 horas de incubación. Los resultados muestran que la capacidad de invasión celular de las cepas ensayadas fue baja, menor a 6 Log₁₀ de la UFC recuperadas/mL luego de la lisis de células MAC-T (Tabla 6):

Tabla 6. Capacidad de invasión de células MAC-T expresada en Log₁₀ de las cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio.

Cepa	Mastitis	Invasión (Log 10 UFC recuperadas/mL) ± DS
5	MP	5,4 ± 1,26
36	MP	5,7 ± 0,91
16	MP	5,9 ± 0,35
17	MP	5,5 ± 0,99
37	MT	5,9 ± 0,70
39	MT	5,7 ± 0,45
42	MT	5,9 ± 0,22
45	MT	5,4 ± 0,61

DS: desviación estándar

Si bien los datos obtenidos de los ensayos de invasión celular no presentaron una distribución normal ($P\text{-value} < 0,05$), fueron homogéneos ($P\text{-value} > 0,05$), por lo que se realizó una prueba de T-test con tal de evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de cepas según su origen (MP o MT) respecto a su capacidad *in vitro* de invasión de células MAC-T. Se observó que la capacidad de invasión celular es independiente del origen de las cepas ($P\text{-value} = 0,3618$), pues no existió una diferencia estadísticamente significativa entre grupos (figura 7):

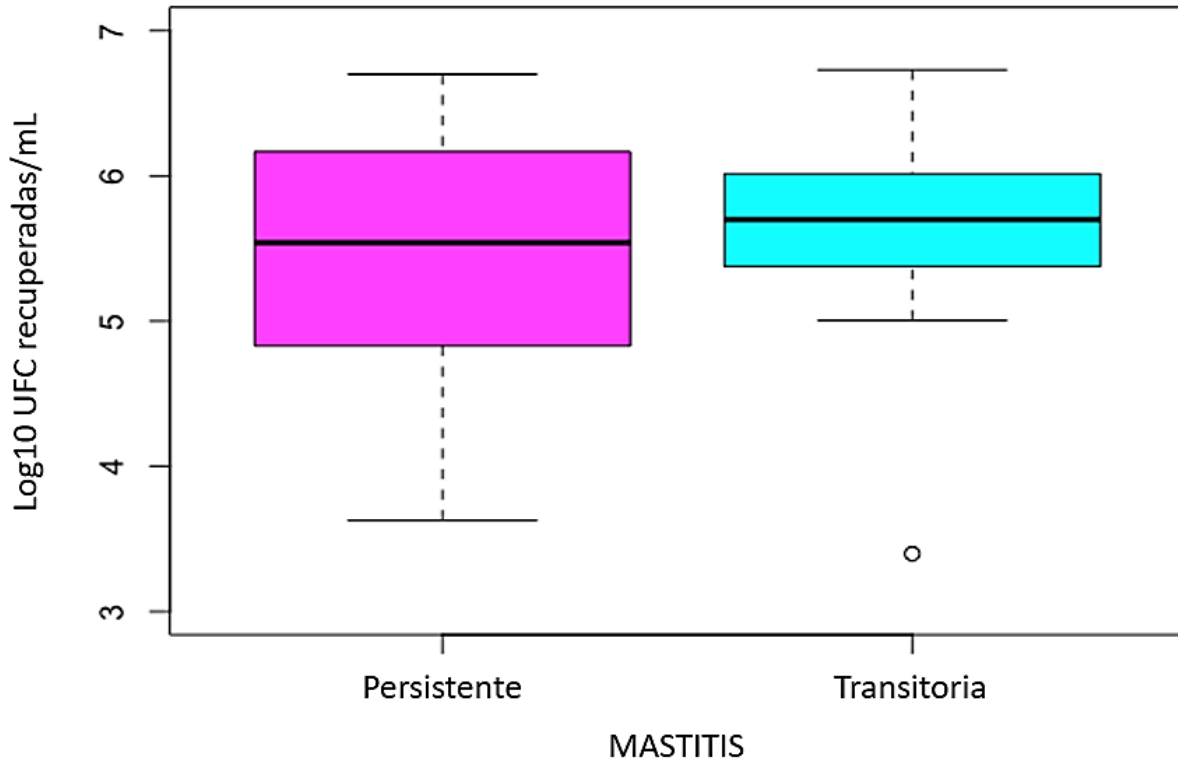


Figura 7. Comparación entre grupos de cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con MP y de vacas con MT respecto a su capacidad *in vitro* de invasión celular. *P-value* = 0,3618. n = 8. T-test.

A partir del análisis de los datos de cada cepa de manera individual respecto a la producción *in vitro* de biofilm y a la capacidad *in vitro* de invasión celular, se realizó una comparación entre ellos, y de manera posterior, una correlación. Del total de cepas, la cepa 5 (proveniente de MP) fue la que más formó biofilm y una de las que menos invadió células MAC-T (figura 8), mientras que la cepa 37 (proveniente de MT) fue la que más invadió células MAC-T y una de las que menos formó biofilm (figura 8). Respecto a la cepa 45 (proveniente de MT), fue la que menos formó biofilm y la que menos invadió células MAC-T (figura 8):

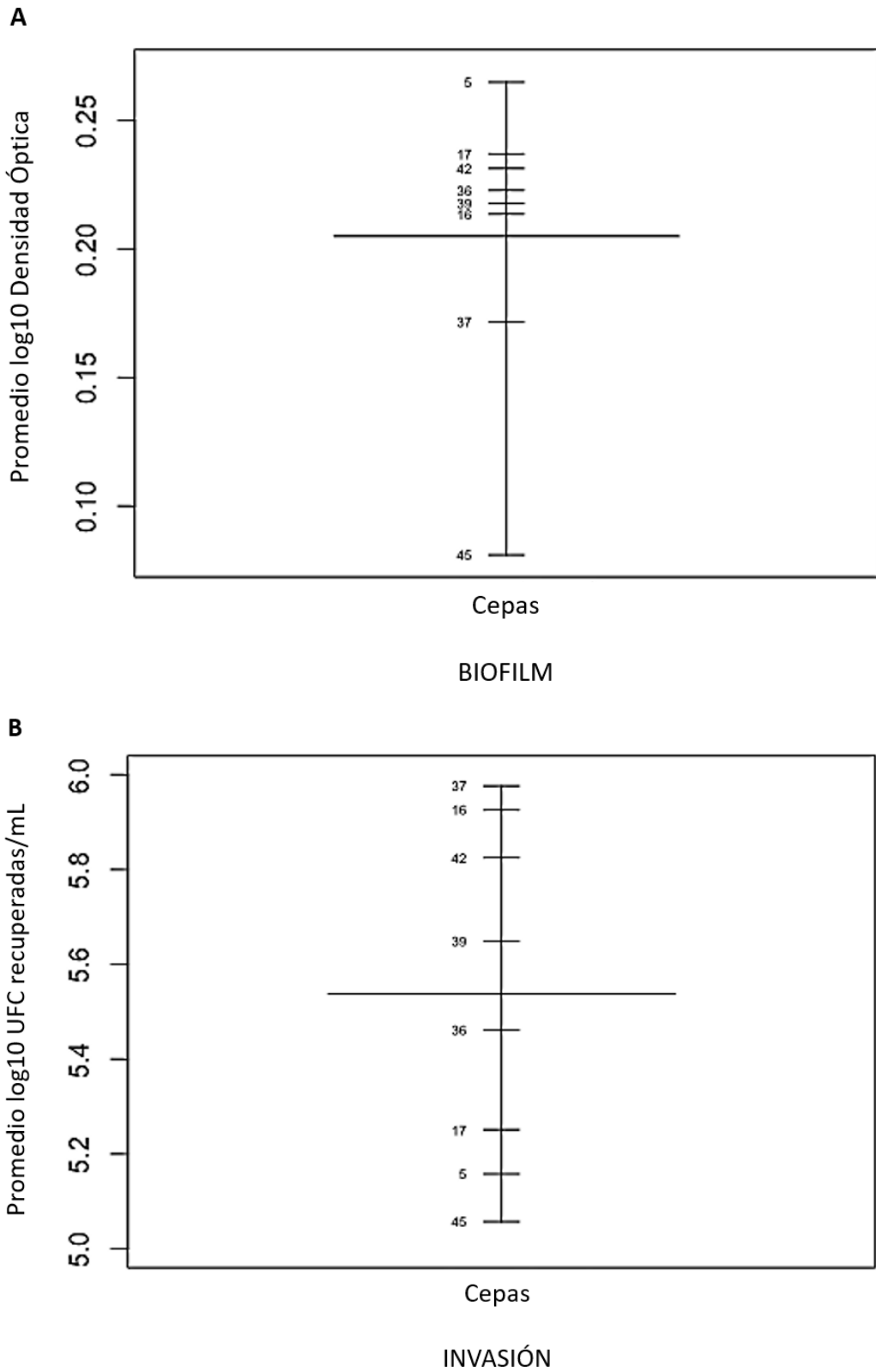


Figura 8. (A) Capacidad *in vitro* de formación de biofilm expresada como el promedio de Log₁₀ de las densidades ópticas de las cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio; **(B)** Capacidad *in vitro* de

invasión celular expresada como el promedio de Log10 de las UFC recuperadas/mL de las cepas de *S. aureus* incluidas en el estudio. Cepas provenientes de vacas con MP: 5, 16, 17 y 36. Cepas provenientes de vacas con MT: 37, 39, 42 y 45.

Sin embargo, al realizar la correlación de Pearson de las variables “formación de biofilm” e “invasión celular” de las cepas, se observó que no existió ningún tipo de correlación ($P\text{-value}= 0,9627$).

7. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que *S. aureus* es capaz de evadir tanto el sistema inmune del hospedero como los tratamientos antibióticos aplicados en las vacas infectadas gracias a su capacidad de formar biofilm, de invadir células epiteliales mamarias y de producir polisacáridos capsulares (Hensen *et al.*, 2000; Camussone & Calvihno, 2013; Boonyayatra *et al.*, 2016; Bardiau *et al.*, 2016). Así mismo, en diversos estudios se ha observado que el progreso de la infección intramamaria por *S. aureus* hacia la cronicidad o persistencia podría estar relacionado con la expresión de combinaciones específicas de estos factores de virulencia (Fournier *et al.*, 2008; Le Maréchal *et al.*, 2011; Pereyra, 2015). Es así como se ha correlacionado la capacidad de formación de biofilm de aislados de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis con su capacidad de invasión celular y con su genotipificación y fenotipificación capsular, observando que aislados *cap5+* y/o *PC5* poseen altas tasas de invasión celular y producen biofilm en forma moderada o fuerte, mientras que aislados *cap8+* y/o *PC8* poseen bajas tasas de invasión celular y producen biofilm en forma débil (Bardiau *et al.*, 2016). Por lo tanto, en esta tesis se postula que cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes poseen mayor capacidad *in vitro* de formar biofilm y de invadir células epiteliales mamarias, a diferencia de aquellas cepas de *S. aureus* que provienen de vacas con mastitis transitorias.

Para el desarrollo de este estudio, 30 aislados de *S. aureus* fueron preseleccionados en base al alto RCS (>200.000 CS/mL) de las muestras de leche de donde provenían y a la persistencia o transitoriedad de la mastitis de cada vaca.

Los aislados fueron caracterizados mediante la detección del gen *mecA* por PCR y la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante CIM y pruebas de difusión en disco. Es importante realizar la detección de SARM en el ganado vacuno lechero debido a que este tipo de cepas son de difícil cura bacteriológica, resistentes a una gran cantidad de familias de antibióticos utilizados

en la industria de la leche para el tratamiento de la MB y a la gran probabilidad de transmisión entre el ganado vacuno y las personas que trabajan directamente con él (Schmidt *et al.*, 2017).

Respecto a los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco, los aislados fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados, a excepción del aislado 42 (proveniente de una vaca con MT), el cual resultó ser resistente a la lincomicina. Estos resultados coinciden con los de Pereyra (2015), quién realizó los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana en un total de 27 cepas de *S. aureus* argentinas procedentes de mastitis bovinas clínicas y subclínicas, no identificando ninguna cepa multirresistente. Por su parte, Pellegrino *et al.* (2011) observaron que el 19% de las cepas de *S. aureus* aisladas de leche presentaron multirresistencia y que el 36,5%, 22,2% y 20,6% presentaron resistencia a la eritromicina, penicilina y estreptomicina respectivamente, sin embargo, aquello no estuvo necesariamente relacionado con la prevalencia del cuadro de mastitis bovina en los predios estudiados. En el caso de Freitas *et al.* (2018), observaron que, de 30 cepas de *S. aureus* procedentes de dos ciudades de Brasil, el 80% fue resistente al menos a ocho de los doce antibióticos ensayados, mientras que el 10% de las cepas fue resistente a los doce antibióticos, observando, por tanto, cepas multirresistentes. Es así como queda de manifiesto la necesidad de una vigilancia permanente de los perfiles de resistencia de cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina en Chile frente a antibióticos de uso frecuente en medicina veterinaria, con tal de evitar la selección de cepas resistentes.

También se debe destacar que, si bien las pruebas de difusión en disco no reflejan necesariamente la actividad del antimicrobiano en la glándula mamaria, sí permite orientar la selección de los antibióticos más eficaces para el tratamiento y la prevención de la mastitis bovina, pues contar con esta información y su variación en el tiempo es de primordial importancia para aplicar un plan de control con tal de que este tenga altas probabilidades de éxito (Pellegrino *et al.*, 2011).

Los resultados de la PCR de *mecA*, así como los resultados de la CIM de oxacilina complementados con los resultados de la prueba de difusión en disco de cefoxitina, indicaron que ninguno de los aislados poseía al gen en su genoma, lo que coincide con los resultados observados por López-Vázquez *et al.* (2015), quienes observaron que sólo 4 de 85 aislados de *S. aureus* fueron *mecA*-positivos (4,7%). En cuanto a Piccini *et al.* (2010), mediante un diseño de microarreglo, analizaron el perfil genético de 33 cepas de *S. aureus* provenientes de once predios lecheros. El análisis mostró la ausencia de genes codificantes de resistencia para todos los antibióticos ensayados (estreptomicina, clindamicina, lincomicina, macrólidos, estreptograminas, neomicina, estreptotricina, trimetoprim, ácido fusídico, mupirocina y glicopeptidos), incluyendo a la meticilina, lo que coincide con nuestros resultados.

En cuanto a la posible detección de cepas de SARM mediada por el gen *mecC*, los resultados de las pruebas de difusión en disco de cefoxitina indicarían que las cepas de *S. aureus* serían meticilino-susceptibles (SASM) a pesar de no haber realizado pruebas de PCR para *mecC*.

En el año 2011, se reportó la aparición de una cepa de *S. aureus* con un “Cassette Cromosómico Estafilocócico” (SCC*mec*) tipo XI a partir de muestras de leche de vacas con mastitis, en el cual el gen *mecA* difería un 30% del gen *mecA* de los otros tipos de SCC*mec* respecto a su secuencia nucleotídica. Además, la proteína expresada presentó solo un 63% de similitud con la “Proteína de Unión a Penicilina 2^a” (PBP-2a). A este gen que codificaba para una nueva PBP-2a se lo llamó *mecC*. Si bien cepas de *S. aureus* *mecC*-positivas han sido ampliamente relacionadas con la actividad veterinaria en animales menores y mayores y animales silvestres, también han sido aisladas de humanos, siendo responsables de hasta el 2% de las infecciones en la población (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018; Reynaga, 2017).

La detección de los genes *mecA* y *mecC* requiere de diseño de partidores específicos para cada uno de ellos. Sin embargo, el uso de discos de cefoxitina ha

demostrado ser eficaz, simple y económico para la detección de las cepas de *S. aureus mecC*-positivas al compararlo con ensayos que sólo utilizan oxacilina, al cual se le han atribuido un gran porcentaje de falsos negativos, invalidando la utilización de este último antimicrobiano como método único de detección de estas cepas (Aguayo-Reyes *et al.*, 2018; Ford, 2018).

Posterior a los análisis de resistencia antimicrobiana, los aislados fueron analizados mediante la técnica de PFGE. La PFGE ha sido aceptada como una técnica “*gold standard*” altamente discriminatoria, sensible y reproducible para distinguir cepas de *S. aureus* y así determinar si un grupo de aislados corresponde a una misma variante clonal; de esta manera es posible realizar estudios epidemiológicos moleculares de aislados de *S. aureus* bovinos (McDougal *et al.*, 2003; Pereyra, 2015). En el presente estudio, mediante PFGE, fue posible determinar que los aislados que provenían de una misma vaca que presentó cuadros de mastitis consecutivos durante un periodo de tiempo determinado, resultaron ser clones entre ellos, lo cual permitió demostrar su persistencia en la glándula mamaria. Así mismo, la PFGE permitió diferenciar a estos aislados de aquellos que fueron pesquisados sólo una vez y que no presentaron relación clonal con ningún otro aislado, coincidiendo con que provenían de distintas vacas que presentaron el cuadro de mastitis sólo una vez durante el periodo de tiempo que fueron muestreadas, o bien que presentaron cuadros de mastitis de manera intermitente en ese mismo periodo, demostrando así la transitoriedad de estos aislados en la glándula mamaria. Por otro lado, tanto los aislados persistentes como los transitorios fueron aislados en los mismos periodos en que las vacas de las que provenían presentaron los cuadros de mastitis, coincidiendo entonces el cuadro clínico con la presencia del patógeno. Si bien se conoce que la mastitis posee una etología múltiple, los patógenos son aislados de acuerdo con su predominancia en la infección (Gomez, 2008), lo que nos hace inferir que lo más probable es que los cuadros de mastitis observados en este estudio fueron causados y/o bien perpetuados por *S. aureus*.

Considerando el reducido número de localidades desde la que se obtuvieron las muestras de leche (dos predios totales, uno ubicado en la zona centro del país y otro ubicado en la zona sur) y el alto número de pulsotipos distintos (quince) de *S. aureus*, se pudo constatar una alta heterogeneidad genética entre los aislados. Sin embargo, no todos los pulsotipos cumplían con los estrictos criterios de inclusión de este estudio respecto a lo que se consideró como una cepa persistente y una transitoria por lo que finalmente fueron seleccionados ocho pulsotipos para la realización de este estudio, 4 provenientes de vacas con MT y 4 provenientes de vacas con MP.

Estudios previos han demostrado que la asociación entre genotipos y factores de virulencia de *S. aureus* favorecería la persistencia de las infecciones mamarias, así como también que cepas de *S. aureus* que causan infecciones persistentes difieren de las que causan infecciones transitorias (Haveri *et al.*, 2007; Piccini *et al.*, 2010; Bardiau *et al.*, 2016). Haveri *et al.* (2007) sugirieron que genes de virulencia son representativos en cepas de *S. aureus* aislados principalmente de mastitis bovinas persistentes, y que su presencia pareciera estar relacionada con el tipo clonal. Por otro lado, Bardiau *et al.* (2016) confirmaron la existencia de dos grupos de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis, basados en su tipificación capsular, sobrevivencia intracelular y tipificación según el gen *agr*, observando que cepas *cap8*-positivas pertenecen al grupo II-*agr* y muestran una baja tasa de invasión, mientras que cepas *cap5*-positivas pertenecen al grupo I-*agr* y muestran una alta tasa de invasión. Es así como en el presente estudio se observaron diferencias entre cepas de *S. aureus* que provenían de MB persistentes y de MB transitorias, tanto en su perfil genético (genes capsulares *cap5* y *cap8*) como en ensayos de funcionalidad *in vitro* (cantidad de biofilm formado).

CAPACIDAD DE PERSISTENCIA DE CEPAS DE *S. aureus* EN LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA SEGÚN SU PERFIL *cap*

Los PC le confieren a *S. aureus* resistencia a la fagocitosis, lo que permite mayor sobrevivencia de la bacteria y, por lo tanto, mayores posibilidades de diseminación. Además de conferir resistencia a la fagocitosis, la importancia de los PC radica en que entre el 94-100% de cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis son capsuladas.

La detección de los genes *cap5* y *cap8* mediante PCR reveló que 62,5% de las cepas de *S. aureus* (4 cepas MP y 1 cepa MT) poseía al gen *cap5* en su genoma; el resto de las cepas MT (37,5%) fueron clasificadas como “no tipificables”. Si bien el número de cepas incluidas en este estudio es pequeño, los resultados coinciden con una gran variedad de otras investigaciones realizadas en diversas partes del mundo (Guidry *et al.*, 1998; O’Riordan & Lee, 2004; Gogoi-Tiwari *et al.*, 2013; Salimena *et al.*, 2016), donde se observó una mayor prevalencia del gen *cap5* en comparación a los otros genes *cap* en cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina. Es así como Bardiau *et al.* (2016) observaron una mayor prevalencia del gen *cap5* en cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina. Al analizar el genoma de ambos grupos, los investigadores sugieren que las cepas “*cap5* del grupo I-*agr*” estarían mejor adaptadas a vivir en ambientes hostiles en comparación a las cepas “*cap8* del grupo II-*agr*”, lo que facilitaría su diseminación y consecuente persistencia en la glándula mamaria. Estos antecedentes coinciden con los resultados de este estudio, donde el 100% de las cepas provenientes de vacas con MP (y, por lo tanto, con las mayores capacidades de persistencia en la glándula mamaria) codificaban para al gen *cap5*.

En cuanto a las cepas de *S. aureus* “no tipificables”, los datos reportados por distintos autores son diversos, ya que los porcentajes de este tipo de cepas varían desde un 53,3% (Reinoso *et al.*, 2008), 36% (Camussone *et al.*, 2012) y 14,82% (Pereyra, 2015). En nuestro estudio, al igual que lo observado por Camussone *et*

al. (2012), el 37,5% de las cepas de *S. aureus* fueron “no tipificables”, existiendo entonces la posibilidad de que sean *cap1*-positivos o *cap2*-positivos.

CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE BIOFILM DE CEPAS DE *S. aureus*

La estructura de biofilm ofrece a *S. aureus* ventajas adaptativas como barrera fisiológica de protección frente a la respuesta inmune del hospedero y a las terapias antimicrobianas, lo que le permite establecerse como fuente continua de infección y contaminación en la glándula mamaria.

Es así como en este estudio se identificaron mediante PCR los genes *bap* y aquellos que forman parte del operón *icaADBC* con tal de poder relacionar su presencia en el genoma de las cepas de *S. aureus* con su capacidad de formación de biofilm. Se observó que las 8 cepas de este estudio poseían tanto a los genes del operón *icaADBC* como al gen *bap* en su genoma, independiente de su origen.

Respecto a los genes que forman parte del operón *icaADBC*, son diversos los estudios que coinciden con nuestros resultados, donde se ha observado que el 100% de las cepas de *S. aureus* que provienen de mastitis bovina codifican para estos genes, independiente de si las mastitis son clínicas o subclínicas (Szweda *et al.*, 2012; Pereyra, 2015). También, altas frecuencias de los genes del operón *icaADBC* han sido reportadas por otros estudios en cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina, como en el estudio realizado por Khoramian *et al.* (2015), quienes detectaron los genes *icaA* e *icaD* en el 91,1% de las cepas.

Respecto al gen *bap*, este fue detectado en el genoma de las 8 cepas de *S. aureus* de nuestro estudio (100%), lo que difiere de otras investigaciones donde no se detectó el gen (Szweda *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013; Khoramian *et al.*, 2015) o bien, donde se detectó con muy baja frecuencia (2,5%) (Darwish & Asfour, 2013). El uso de partidores diseñados específicamente para la tesis de Zúñiga (2016) debido al nulo reconocimiento del gen *bap* por parte de los partidores publicados

por otros autores en el análisis *in silico* (BLAST), podría explicar la alta detección de *bap* en esta oportunidad.

Si bien nuestros resultados respecto a la presencia del gen *bap* no concuerdan con los de una gran variedad de investigadores, los antecedentes indican que *bap* es capaz de mediar un mecanismo de formación de biofilm alternativo al mecanismo regular dependiente del operón *icaADBC* (Cucarella *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005; Lasa & Penadés, 2006), y que cepas *bap*-positivas aumentan significativamente la capacidad de los microorganismos para colonizar y persistir en la glándula mamaria bovina en estudios *in vivo* (Cucarella *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005). Además, diversos investigadores han observado que animales naturalmente infectados con cepas de *S. aureus* *bap*-positivas presentan un menor recuento de células somáticas en la leche, lo que implica una menor inflamación en la glándula mamaria y, por lo tanto, una mayor capacidad de colonización de los microorganismos, lo que se asociaría con la persistencia de estas infecciones en un hospedero inmunocompetente (Cucarella *et al.*, 2004; Thurlow *et al.*, 2011). Debido a esta razón, en este estudio se esperaba que las cepas de *S. aureus* procedentes de vacas con MP presentaran mayores porcentajes de prevalencia del gen *bap* en comparación con las cepas procedentes de vacas con MT, a pesar del número pequeño de cepas incluidas en este estudio. En este aspecto, nuestros resultados dejan abierta la posibilidad de que el gen *bap* haya sido sub-detectado en investigaciones anteriores y que, en cambio, posea una gran prevalencia en cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina, pues en los estudios realizados por Szweda *et al.* (2012), Tang *et al.* (2013) y Khoramian *et al.* (2015) (entre otros), las cepas de *S. aureus* poseían una gran capacidad de formación de biofilm a pesar de ser cepas *bap*-negativas, lo que no concordaría con lo observado por Cucarella *et al.* (2004), Tormo *et al.* (2005) y Lasa & Penadés (2006), quienes observaron que la alteración del locus *ica* en una cepa *bap*-positiva no tuvo efecto en la formación *in vitro* de biofilm; sin embargo, al mutar el gen *bap*, se observó una reducción en la formación de biofilm (Lasa & Penadés, 2006). Por otro lado, en un estudio realizado en Brasil donde se evaluaron 50 cepas de *S. aureus* obtenidas de leches mastíticas,

se observó que el 80% de ellas eran capaces de producir biofilm *in vitro* a pesar de que sólo un 12 y un 14% presentó los genes *icaA* e *icaD* respectivamente. Por lo tanto, los mismos autores de ese estudio propusieron que dicho resultado podría deberse a la coexistencia de otros mecanismos de producción de biofilm en *S. aureus* (Coelho *et al.*, 2011). En este sentido, consideramos que el diseño de mutantes y ensayos de expresión génica podrían incrementar los conocimientos que se tiene acerca del rol de *bap* en la formación de biofilm.

Respecto a la capacidad *in vitro* de formación de biofilm en microplaca, en este estudio se realizaron dichos ensayos utilizando medio de cultivo suplementado con lactosa (4,8%). Desde su desarrollo, la prueba de la placa de microtitulación de 96 pocillos ha sido el ensayo más frecuentemente utilizado para la evaluación cuantitativa de la capacidad de formación de biofilm bacteriano, realizándose generalmente en condiciones que rara vez se encuentran presentes en un modelo *in vivo*, por lo que los resultados pueden no reflejar la verdadera capacidad de formación de biofilm de los aislados, pues la mayoría de los ensayos de formación de biofilm se realizan con medios de cultivo estándar que no se correlacionan con los constituyentes de la leche (Snel *et al.*, 2014). Seixas *et al.* (2015) observaron que la producción de biofilm en algunos aislados de *S. aureus* aumentaba al imitar las condiciones naturales de la ubre, lo cual fue comprobado al utilizar leche como medio de cultivo, demostrando ser un factor que aumentaba la formación de biofilm. Xue *et al.* (2014) demostraron que tanto el uso de leche como medio de cultivo como también la adición de lactosa en diversas concentraciones aumentó la capacidad de producción de biofilm de dos aislados totales de *S. aureus*, estando en ambos casos involucrado el aumento de producción de PIA.

Es así como en este estudio se observó que las 8 cepas de *S. aureus* (100%) fueron capaces de formar biofilm, lo que era de esperar ya que todas poseían los genes del operón *icaADBC* y al gen *bap* en su genoma. Estos resultados coinciden con lo descrito por Cucarella *et al.* (2004), quienes observaron que el 100% de cepas de *S. aureus* *ica*-positivas y *bap*-positivas fueron capaces de formar biofilm

mediante la metodología de microplaca. Son variados los autores que han observado que los resultados obtenidos mediante microplaca y posterior lectura por espectrofotometría son los más objetivos, precisos y reproducibles (Mathur *et al.*, 2006; Szweda *et al.*, 2012).

En este estudio además se observó que, de las 8 cepas de *S. aureus*, 6 formaron biofilm de manera fuerte y 2 formaron biofilm de manera moderada; estas últimas fueron cepas que provenían de vacas con MT. Los biofilms ofrecen a los microorganismos ventajas adaptativas como barrera fisiológica de protección frente a la respuesta inmune del hospedero y a las terapias antimicrobianas. Es así como muchos autores han probado que, en el caso de mastitis bovina causada por *S. aureus*, su capacidad de producir biofilm es la razón más importante para el poco éxito en la erradicación de la infección, con su consecuente persistencia en la glándula mamaria (Szweda *et al.*, 2012). Por lo tanto, en este estudio se esperaba que cepas provenientes de vacas con MP presentaran mayor capacidad de formación de biofilm que aquellas provenientes de vacas con MT.

Respecto a la cantidad de biofilm producido, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de cepas que provenían de vacas con MP y el grupo de cepas que provenían de vacas con MT (T-test; *P*-value = 0,04705): las cepas provenientes de vacas con MP formaron más cantidad de biofilm que las cepas provenientes de MT, lo que coinciden con lo reportado por Salimena *et al.* (2016), quienes observaron que cepas de *S. aureus cap5*-positivas y con mayor capacidad de persistencia en la glándula mamaria, eran capaces de producir más biofilm en comparación a cepas de *S. aureus cap5*-negativas.

En cuanto a los genes del operón *icaADBC* y al gen *bap*, su presencia en el genoma de las cepas no puede explicar la diferencia en la producción de biofilm que existe entre ambos grupos, dejando de manifiesto la necesidad de determinar los niveles de expresión de estos genes y/o de evaluar mecanismos alternativos de formación de biofilm.

CAPACIDAD DE INVASIÓN CELULAR DE CEPAS DE *S. aureus*

Clásicamente, *Staphylococcus spp.* habían sido considerados como patógenos extracelulares, sin embargo, hoy en día está ampliamente aceptado que cepas de *S. aureus* poseen la capacidad de internalizarse en las células de un hospedero, ya sea este humano o bovino.

Pese a que existe una gran variedad de MSCRAMMs, aquellas fundamentales para la adhesión y consecuente invasión de células epiteliales mamarias son las FnbPs, pues la patogénesis de la mastitis bovina estaría relacionada esencialmente con la síntesis de dichas proteínas. Las FnbPs son consideradas como mediadores para el proceso de formación de biofilm y también participan en el proceso de invasión celular, lo que ha sido observado en una gran cantidad de estudios.

En este estudio, las 8 cepas de *S. aureus* codificaron para ambos genes *fnbs* en su genoma, lo que coincide con los datos reportados por Pereyra (2015), quien identificó a los genes *fnbA* y *fnbB* en el 96,3% y 97,5% de cepas de *S. aureus* respectivamente, independiente si el origen de estas era MB clínica o subclínica.

Se postula que aparentemente no existen diferencias en la capacidad de unión a fibronectina entre las cepas de *S. aureus* que portan uno o ambos genes, sin embargo, un estudio que analizó una gran colección de aislados de *S. aureus* desde pacientes humanos infectados, indicó que cepas de *S. aureus* asociadas a enfermedades invasivas tenían mayores posibilidades de poseer ambos genes (Peacock *et al.*, 2000). Así mismo, en un estudio realizado por Shinji *et al.* (2011) se observó que, si bien la proteína FnBA fue más importante para las infecciones en ensayos *in vitro* e *in vivo*, la cooperación entre FnBPA y FnBPB fue indispensable para la inducción de infecciones severas en roedores, que resultó en una mortalidad total por sepsis. De manera complementaria, se ha observado que en los estudios

donde se han utilizado cepas mutantes de los genes *fnbA* y *fnbB*, la eficiencia en la invasión de células MAC-T se redujo en más del 95% respecto a cepas silvestres debido a la reducción de la adhesión, a pesar de que *S. aureus* posee la capacidad de codificar para otras adhesinas (Dziewanowska *et al.*, 1999).

Por lo tanto, en nuestro estudio se esperaba que existieran diferencias en la frecuencia de detección de ambos genes entre las cepas provenientes de vacas con MP y las cepas provenientes de vacas con MT, con una consecuente diferencia en sus capacidades *in vitro* de invasión celular. Sin embargo, dichas diferencias no fueron observadas entre los grupos de cepas provenientes de MP y las cepas provenientes de MT (T-test, $P\text{-value}>0,05$). Además, la capacidad *in vitro* de invasión celular de las cepas durante las dos horas de ensayo fue baja (menor a 6 Log₁₀ UFC recuperadas/mL), a pesar de la presencia de ambos genes en el genoma de las cepas, lo que podría ser explicado por la presencia del gen *bap*. Los resultados de Valle *et al.* (2012) sugirieron que Bap promueve la adhesión intercelular, pero evita la entrada de *S. aureus* en las células epiteliales ya que se identificó una unión directa entre la proteína Bap y una proteína chaperona de las células del hospedero, la Gp96/GRP94/Hsp90. La interacción de Bap con Gp96 provocó una reducción significativa en la capacidad de *S. aureus* para invadir células epiteliales al interferir con la vía de las FnBPs. De acuerdo con estos resultados, las cepas deficientes de Bap tuvieron una mayor capacidad para invadir células epiteliales en un modelo de mastitis en roedores lactantes. Por lo tanto, componentes de la matriz del biofilm podrían influir en la capacidad de cepas de *S. aureus* para invadir células epiteliales.

En cuanto al proceso de adhesión celular de *S. aureus*, experimentalmente esta capacidad se evalúa mediante el conteo de UFC adheridas a células/mL, previo contacto de una cantidad determinada de bacterias/células eucariontes por un tiempo definido, y con el posterior lavado de los pocillos con PBS para la eliminación de las bacterias no adheridas; las células con las bacterias adheridas son despegadas de los pocillos con solución de tripsina.

En el presente estudio no se evaluó la capacidad de adhesión de las cepas de *S. aureus*, sin embargo, otros estudios han observado que 100% de los aislados de *S. aureus* se adhiere a células epiteliales mamarias bovinas (CEMB) (Castilho *et al.*, 2017), pues es sabido que es necesario que se produzca el proceso de adhesión celular para que la bacteria pueda llevar a cabo el proceso de invasión. Castilho *et al.* (2017) observaron que dos de sus aislados de *S. aureus* (ambos *bap*-positivos) presentaron los mayores porcentajes de adhesión celular respecto a otras cepas ensayadas, aunque sus porcentajes de invasión fueron los más bajos. Por lo tanto, según lo observado por Valle *et al.* (2012) respecto al gen *bap*, Castilho *et al.* podrían haber asociado los bajos porcentajes de invasión celular con la presencia de este gen. Sin embargo, otros aislados presentaron porcentajes de invasión del 85% a pesar de poseer el gen *bap* en su genoma, lo que sugiere que la habilidad de *bap* para disminuir la capacidad de invasión celular de cepas de *S. aureus* puede depender de su interacción con otros factores genéticos. Por otro lado, Castilho *et al.* observaron que sus dos aislados *bap*-positivos presentaron los mayores porcentajes de adhesión celular y los menores porcentajes de invasión, además de haber sido los que formaron más biofilm, demostrando que el proceso de adhesión celular y de formación de biofilm están estrechamente relacionados. Esto concordaría con nuestros resultados los cuales, si bien no poseen una correlación, indican que la cepa que más formó biofilm fue una de las que presentó menor capacidad de invasión celular (cepa 5) y viceversa (cepa 37). Respecto a la cepa 45, esta presentó tanto la menor capacidad de formación de biofilm como de invasión celular, lo que hace inferir que no poseía una buena capacidad de adhesión a pesar de haber poseído los genes *bap*, *fnbA* y *fnbB* en su genoma.

8. CONCLUSIONES

- Las cuatro cepas de *S. aureus* obtenidas de vacas con mastitis persistentes se diferencian de las cuatro cepas obtenidas de vacas con mastitis transitorias en su genotipificación capsular (presencia de gen *cap5* en el genoma) y por presentar una mayor capacidad de formar biofilm fuerte.
- Las ocho cepas de *S. aureus* presentaron una capacidad de invasión equivalente que resultó ser independiente de la manifestación de la mastitis desde donde fueron aisladas (mastitis persistente o mastitis transitoria).
- Cepas específicas de *S. aureus* (mismo perfil genético o pulsotipo) pueden mantenerse hasta por un mínimo de cuatro meses en la glándula mamaria de vacas con mastitis persistentes.
- La susceptibilidad a los antibióticos y la presencia de genes asociados a la formación de biofilm e invasión celular en las cepas de *S. aureus* fue independiente de la manifestación de la mastitis desde donde fueron aisladas (mastitis persistente o mastitis transitoria).
- La capacidad *in vitro* de formación de biofilm de las ocho cepas de *S. aureus* resultó ser independiente de su capacidad *in vitro* de invasión en células MAC-T.
- La resistencia a la meticilina no fue un problema detectado en las cepas de *S. aureus* de este estudio.

9. PROYECCIONES

- El aumento del tamaño de la muestra (cepas de *S. aureus* provenientes de vacas con mastitis persistentes y transitorias) permitirá obtener un análisis más representativo respecto a la genotipificación capsular, a la capacidad de formación de biofilm y a la capacidad de invasión celular de cepas de *S. aureus*.
- La determinación de los niveles de expresión de los genes involucrados en la formación de biofilm conducirá a explicar la falta de asociación entre la presencia de estos y las diferencias entre las cepas de *S. aureus* estudiadas respecto a su capacidad *in vitro* de formación de biofilm.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDALLAH M., BENOLIEL C., DRIDER D., DHULSTER P. & CHIHIB N.E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol.* 196: 453-472.
2. ABDEL-RADY A. & SAYED M. (2009). Epidemiological Studies on Subclinical Mastitis in Dairy cows in Assiut Governorate. *Vet World.* 2(10): 373-380.
3. AGUAYO-REYES A., QUEZADA-AGUILUZ M., MELLA S., RIEDEL G., *et al.* (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev Chilena Infectol.* 35(1): 7-14.
4. ALMEIDA R., MATTHEWS K., CIFRIAN E., GUIDRY A. & OLIVER S. (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 79(6): 1021-1026.
5. ARCIOLA C., BALDASSARRI L. & MONTERO 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: 2151-2156.
6. ARSLAN E., CELEBI A., ACIK L., & UCAN U. S. (2009). Characterization of coagulase positive *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis using protein and plasmid patterns. *Turk J Vet Anim Sci.* 33(6): 493-500.
7. ATSHAN S., NOR SHAMSUDIN M., SEKAWI Z., LUNG L., HAMAT R., *et al.* (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 1-10.
8. BARDIAU M., DETILLEUX J., FAFNIR F., MAINIL J. & OTE I. (2014). Associations properties linked with persistence in a collection of

Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 169: 74-79.

9. BARDIAU M., CAPLIN J., DETILLEUX J., GRABER H., *et al.* (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 Mic.* 185: 1 -6.
10. BASTOS M., COUTINHO B. & COELHO M. (2010). Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals.* 3(4): 1139-1161.
11. BEURON D., CORTINHAS C., BOTARO G., MACEDO S., *et al.* (2014). Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Pesq Vet Bras.* 34(10): 947-952.
12. BOONYAYATRA S., PATA P., NAKHARUTHAI P. & CHAISRI W. (2016). Antimicrobial Resistance of Biofilm-Forming *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. *J Vet Sci Technol.* 7(5): 1-5.
13. BROUILLETTE E., GRONDIN G., SHKRETA L., LACASSE P. & TALBOT B. (2003). In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog.* 35: 159-168.
14. CAMARENA J. & SÁNCHEZ R (2014). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* [En línea]: https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sar_m.pdf

15. CAMUSSONE C., REFIJ P., PUJATO N., SCHWAB A., *et al.* (2012). Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Braz J Microbiol.* 43: 1010-1014.
16. CAMUSSONE C. & CALVINHO L. (2013). Virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infections in cows: Relevance and role as immunogens. *Revist Argent Microbiol.* 45(2): 119-130.
17. CAPURRO A., CONCHA C., NILSSON L. & OSTENSSON K. (1999). Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet Scand.* 40: 315-321.
18. CASTAÑÓN-SÁNCHEZ C. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evid Méd Invest Salud.* 5(3): 79-84.
19. CASTHILO I., ALVES S., LANGONI H., ARAÚJO J., *et al.* (2017). Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 100: 1-8.
20. CASTILLO M., SUNIAGA J., ROJAS G., HERNÁNDEZ J, *et al.* (2009). Estudio de prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado de Mérida. *Agricult And.* 16: 39-48.
21. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2010). Approved standard M2-A10. Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, 10th ed. CLSI, Wayne, Pa.

22. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). CLSI supplement VET01S. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals, 3rd ed. Wayne, PA.
23. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2016). CLSI supplement M100S. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26 th ed. Wayne, PA.
24. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). CLSI supplement VET06. Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria isolated from animals, 1 st ed. Wayne, PA.
25. COELHO S., PEREIRA I., SOARES L., PRIBUL B. & SOUZA M. (2011). Short communication: profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci.* 94:3305-10.
26. CONCHA, C. (2007). Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. *Publicación Técnico-Ganadera, Facultad de Cs Agrónomas, Universidad de Chile*, 33.
27. CORRIGAN R., RIGBY D., HANDLEY P. & FOSTER T. (2007). The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiol.* 153: 2435-2446.
28. COSTERTON J., STEWART P. & GREENBERG E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322.
29. CUCARELLA C., TORMO M., ÚBEDA C., TROTONDA M., *et al.* (2004). Role of Biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 72(4): 2177-2185.

30. DARWISH S. & ASFOUR H. (2013). Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci World J.* 2013: 1-9.
31. DE VliegHER S., FOX L., PIEPERS S., MCDougALL S. & BARkEMA H. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention and control. *J Dairy Sci.* 95: 1025-1040.
32. DUNNE W. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 15: 155-166.
33. DZIEWANOWSKA K., PATTI J., DEOBALD C., BAYLES K., TRUMBLE W. & BOHACH G. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun.* 67: 4673-4678.
34. FAO (2014). Impact of mastitis in small scale dairy production systems. *Animal Production and Health Working Paper.* No. 13. Rome.
35. FIADH H. (2011). Detection of biofilm formation among the mastitis isolates of Staphylococci by evaluation of three different screening methods. *Kufa J Vet Med Sciences.* 2 (2): 107-115.
36. FORD BA. (2018). *mecC*-harboring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Hiding un plain sight. *J Clin Microbiol.* 56(1).
37. FOSTER T., GEOGHEGAN J., GANESH V. & HOOK M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 12: 49-62.

38. FOURNIER C., KUHNERT P., FREY J., MISEREZ R., *et al.* (2008). Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 85: 439-448.
39. FREITAS 2018 Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. *Braz. J. Biol.* 78(4): 661-666.
40. GANDRA E., FERNANDEZ M., SILVA J. & SILVA W. (2011). Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. *Ciênc. Tecnol Aliment.* 31(4): 946-949.
41. GASQUE R. (2008). Enciclopedia Bovina. 2da Edición. Ed. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Capítulo 11 978-970-32-4359-4364. 182-187.
42. GOGOI-TIWARI J., BABRA C., TIWARI H., WILLIAMS V., *et al.* (2013). Trends In therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview. *J Vaccines Vaccin.* 4 (2): 176-187.
43. GOMEZ R. (2008). Enciclopedia bovina. En R. G. Gomez, Enciclopedia Bovina (págs. 176-181). Mexico: Edición Electronica. Obtenido de <http://es.slideshare.net/tcheco55/enciclopedia-bovina-unam>
44. GRUNDMEIER M., HUSSAIN M., BECKER P., HERLMANN C., PETERS G. & SINHA B. (2004). Truncation of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Leads to Deficient Adherence and Host Cell Invasion Due to Loss of the Cell Wall Anchor Function. *Infect Immun.* 72(12): 7155–7163.

45. GUIDRY A., FATTOM A., PATEL A., O'BRIEN C. *et al.* (1997). Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol.* 59: 53 – 58.
46. GUIDRY A., FATTOM A., PATEL A., O'BRIEN C., SHEPHERD C., LOHUIS J. (1998). Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am J Vet Res.* 59: 1537–1539.
47. HARMON, R. (1996). Controlling Contagious Mastitis. *National Mastitis Council.* 11.
48. 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.
49. HENSEN S., PAVICIC M., LOHUIS J., DE HOOG J. & POUTREL B. (2000). Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J Dairy Sci.* 83: 1966-1975.
50. JOO H. & OTTO M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol.* 19(12): 1503-1513.
51. JEFFERSON K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiol Lett.* 236: 163-173.
52. JUHÁSZ-KASZANYITZKY E., JÁNOSI S., SOMOGYI P., DÁN A., VANDERGRAAF L., VAN DUIJKEREN E. & WAGENAAR J. (2007). MRSA Transmission between Cows and Humans. *Emerg Infect Dis.* 13(4): 630–632.

53. 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: 73-77.
54. KLEIN R., FABRES-KLEIN M., BRITO M., FIETTO L. & RIBON O. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.* 160: 183-188.
55. KUMAR R., YADAV B., ANAND S. & SINGH R. (2011). Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. *Microbial Pathogenesis.* 51: 31-38.
56. KWON N., PARK K., MOON J., JUNG W., *et al.* (2005). Staphylococcal cassette chromosome *mec*(SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 56(4): 624-632.
57. LASA I. & PENADÉS J. (2006). Bap: A family of Surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol.* 157(2): 99-107.
58. LE MARÉCHAL C., JARDIN J., HERNANDEZ D., JAN G., *et al.* (2011). Molecular basis of virulence of *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One.* 6: 27354.
59. LÓPEZ-VASQUEZ M., MARTÍNEZ-CASTAÑEDA J., TALAVERA-ROJAS M., VALDEZ-ALARCÓN J., *et al.* (2015). Detección de los genes *mecA*, *mecR1* y *mecI* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina de origen

bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar, México. *Arch Med Vet.* 47: 245-249.

60. MATHUR T., SINGHAL S., KLAN S., UPADHYAY DJ., *et al.* (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening method. *Indian J Med Microbiol*, 24: 25-29.
61. MCDUGAL L., STEWARD C., KILLGORE G., CHAITRAM J., MCALLISTER S. & TENOVER F. (2003). Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. *J Clin Microbiol.* 41(11): 5113-5120.
62. MELCHIOR M., VAARKAMP H. & FINK-GREMMELS J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections?. *Vet J.* 171: 398-407.
63. MELCHIOR M., FINK-GREMMELS J. & GAASTRA W. (2007). Extended antimicrobial susceptibility for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Vet Microbiol.* 125(1-2): 141-149.
64. MURAKAMI K., MINAMIDE K., WADA K., NAKAMURA E., TERAOKA H. & WATANABE S. (1991). Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 29: 2240-2244.
65. NMC, National Mastitis Council. (1987). Una Práctica Mirada a la Mastitis Ambiental. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 342.
66. OMS, Organización Mundial de la Salud (2005). Manual de Bioseguridad en el laboratorio. Tercera edición. Ginebra, Suiza.

67. O'RIORDAN K. & LEE J. (2004). *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1): 218-234.
68. OTE I., TAMINIAU B., DUPREZ J., DIZIER I. & MAINIL J. (2011). Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 153: 285-292.
69. OTTO M. (2013). Staphylococcal infections: Mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.* 64:175-88.
70. PEACOCK S., DAY N., THOMAS M., BERENDT A. & FOSTER T. (2000). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in fnb genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect.* 41: 23-31.
71. PEDRAZA C. (1991). Efecto de la mastitis clínica sobre la producción de leche. *Agricult Téc.* 51(4): 298 -305.
72. PELLEGRINO M., FROLA I., ODIERNO L. & BOGNI C. (2011). Bovine mastitis: antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk. *REDVET.* 12(7): 1-14.
73. PEREYRA, E. (2015). Estudios in vivo e in vitro sobre aspectos de la interacción patógeno-hospedador a partir de cepas seleccionadas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones intramamarias en bovinos. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
74. PERIASAMY S., HWANG-SOO J., DUOG A., BACH T., *et al.* (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *PNAS.* 4(109): 1281-1286.

75. PICCINI R., BORROMEIO V. & Zecconi A. (2010). Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. *Vet Microbiol.* 145: 100-105.
76. PUIG Y., ESPINO M., LEYVA V., APÓRTELA N., PÉREZ Y. & SOTO P. (2015). Resistencia antimicrobiana en cepas de *Estafilococos* coagulasa positiva aisladas en alimentos y manipuladores. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 25(2): 245-260.
77. RANJAN R., GUPTA M. & SINGH K. (2011). Study of bovine mastitis in different climatic conditions in Jharkhand, India. *Vet World.* 4(5): 205-208.
78. REINOSO EB., EL-SAYED A., LAMMBER C., BOGNI C., *et al.* (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol Res.* 163: 314-322.
79. REYNAGA, A. (2017). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina CC398 en un área con una alta densidad de granjas de cerdos. Tesis para optar al grado de Doctor en Medicina. Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona.
80. SAIDI R., KHELEF D. & KAIDI R. (2013). Bovine mastitis: Prevalence of bacterial pathogens and evaluation of early screening test. *Afr J Microbiol Res.* 7(9): 777-782.
81. SALIMENA A., LANGE C., CAMUSSONE C., SIGNORINI M., *et al.* (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 (3-4): 97-106.

82. SCHELIN J., WALLIN-CARLQUIST N., COHN M., LINDQVIST R., BARKER G. & RADSTROM P. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2: 580-592.
83. SCHMIDT T., KOCK M. & EHLERS M. (2017). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: genetic diversity and inter-species host transmission. *Front Microbiol.* 8: 511-525.
84. SEIXAS R., VARANDA D., BEXIGA R., TAVARES L. & OLIVEIRA M. (2015). Biofilm-formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolates from subclinical mastitis in conditions mimicking the udder environment. *Pol J Vet Sci.* 18(4): 787-792.
85. SHINJI H., YOSIZAWA Y., TAJIMA A., IWASE T., *et al.* (2011). Role of fibronectin-binding proteins A and B in In Vitro cellular infections and In Vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 79(6): 2215-2223.
86. SNEL G., MALVISI M., PILLA R. & PICCININI R. (2014). Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 174(3): 489-495.
87. SZWEDA P., SCHIELMANN M., MILEWSKI S., FRANKOWSKA A. & JAKUBCZAK A. (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Pol J Microbiol.* 61: 65-69.
88. TANG J., CHEN J., LI H., ZENG P. & LI J. (2013). Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among

Staphylococcus aureus strains isolated from different sources. *Foodborne Pathog Dis.* 10: 757-763.

89. THURLOW L., HANKE M., FRITZ T., ANGLE A. *et al.* (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol.* 186: 6585-6596.
90. TOLLERSRUD T, KENNY K., REITZ A., LEE J. *et al.* (2000). Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus* and others *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol.* 38: 2998-3003.
91. TORMO M., KNECHT E., GOTZ F., LASA I. & PENADÉS J. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. *Microbiol.* 151(7): 2465-2475.
92. VALERA R., CABALLERO C., LINARES F., NOVOA R. & CASANOVAS E. (2005). Calidad sanitaria de la leche en rebaños con mastitis subclínica bovina bajo el efecto de la aplicación de un nosodes homeopático. *Rev Salud Animal.* 27: 80-83.
93. VALLE J., LATASA C., GIL C., TOLEDO-ARANA A., *et al.* (2012). Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog.* 8, e1002843.
94. VERDIER I., DURAND G., BES M., TAYLOR K. *et al.* (2007). Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J Clin Microbiol.* 45: 725–729.

95. XUE T., CHEN X. & SHANG F. (2014). Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *Dairy Sci.* 97: 6129-6134.