

*Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas Fco-Qcas y Naturales  
Departamento de Microbiología e Inmunología*



T.564



**“Estudio de Factores de  
de Virulencia de cepas de  
*Streptococcus uberis*  
aisladas de Mastitis Bovina”**

TESIS DOCTORAL  
2009

*Mirta Cristina Lasagno*

LASAGNO, M.C.  
Estudio de Factores

2009

66129

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

DIRECTOR: Dra. Liliana Odierno

Aprobada por el Jurado de Tesis:



Dra Sofia Chulze



Dr Luis Calvinho



Dra Adriana Torres

Abril 2009



08120

*A César*

*A María José, Diego y Gabriel*

66129

MFN:
Clasif: T.564

## Agradecimientos

A Dios, porque a través de la microbiología me permite descubrir y maravillarme con la perfección de la creación. Deseo que el modesto aporte de mi trabajo sirva para darle gloria y alabanzas a Él.

A mi familia César, María José, Diego y Gabriel por ser el sostén de mi vida.

A mi hermano Guillermo por su incondicional aporte en cuestiones informáticas.

A mi Directora Liliana Odierno por abrirme las puertas del laboratorio de genética microbiana, por la confianza que depositó en mí, especialmente por su dedicación en la dirección de esta tesis, y por su cálida amistad.

A Cristina Bogni por sus pertinentes aportes en la discusión de los resultados y al estímulo dado en los momentos difíciles.

A la Dra Elina Reinoso por su valiosa colaboración en los estudios genéticos y en la discusión de los resultados.

A la Dra Claudia Raspanti por su permanente disponibilidad

A Silvana, Pablo y Laura por su valiosa ayuda en las tomas de muestras, durante el ensayo con las cabras.

Al Dr. Alejandro Larriestra por su inestimable colaboración en los ensayos con las cabras, ya que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible; también por sus aportes en la elaboración de gráficos y en la discusión de los resultados.

A Claudina Vissio por las horas dedicadas a los recuentos leucocitarios y a la elaboración de los gráficos

Al Dr. O. Forchetti por su activa participación en los análisis clínicos de las muestras de sangre de las cabras y sus valiosos aportes críticos al ensayo.

A Matías Pellegrino e Ignacio Frola por su ayuda en la elaboración de gráficos y con el Power Point.

A Ileana Wil por su ayuda en los estudios de invasión.

A las Dras. Noemí Rodríguez, Elizabeth Witowski y Cecilia Greco por su desinteresado asesoramiento para la obtención del inmunosuero de conejo.

A Santiago Saldaño por la gran ayuda prestada en las experiencias realizadas con conejos y con las extracciones de sangre al carnero a lo largo de todos estos años.

Al Dr. C. Perfumo por llevar a cabo los estudios histopatológicos e Inmunohistoquímicos en las cabras.

A la Dra Fernanda Buzzola por recibirme en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.B.A. y dedicarme su tiempo para el desarrollo de los ensayos de invasión.

Al Dr Luis Calvino por los apreciables aportes científicos y el asesoramiento prestado.

A las Dras Sofía Chulze y Adriana Torres por las pertinentes correcciones y sugerencias aportadas.

*Resumen*

## RESUMEN

*Streptococcus uberis* es reconocido a nivel mundial como el patógeno ambiental más importante asociado a mastitis clínica y subclínica en vacas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar aspectos fenotípicos y genotípicos de cepas de *S. uberis* y elucidar la patogénesis temprana ocasionada por esta especie bacteriana. Se aislaron 178 cepas de estreptococos a partir de leche de vacas con mastitis clínica (MC) y subclínica (MS) provenientes de 18 tambos pertenecientes a las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires. Cincuenta y cuatro cepas, 17 aisladas de MC y 37 de MS, fueron identificadas como *S. uberis* mediante pruebas bacteriológicas. Se identificaron 21 perfiles bioquímicos, mostrando la marcada variabilidad fisiológica presentada por las cepas de esta especie. El 76,5% de las cepas de MC y el 81,1% de las cepas de MS fueron confirmadas como *S. uberis* mediante la técnica molecular de polimorfismos de los fragmentos de restricción.

Del estudio *in vitro* de los factores de virulencia en las 43 cepas de *S. uberis* se determinó la producción de cápsula (C) en el 60% de las cepas de ambos orígenes. El factor activador de plasminógeno (FAP) fue detectado en el 84,7% de las cepas de MC y en el 63% de las cepas de MS. Se detectó la producción de factor uberis (FU) en el 23 % de las cepas de ambos orígenes. La producción de hialuronidasa se encontró en el 62 % de las cepas de MC y MS. El 97,7% de las cepas presentaron  $\alpha$ -hemólisis. Se identificó producción de proteasa en el 69,2% y 93,3% de las cepas de MC y MS, respectivamente. Entre las 43 cepas de *S. uberis* se reconocieron 19 perfiles de virulencia. Se identificaron 14 perfiles genéticos en 32 cepas de *S. uberis* analizadas mediante electroforesis de campos pulsantes. En general, no se encontró relación entre perfiles genotípicos, perfiles de virulencia, origen y tambo de procedencia.

Además, se investigó la presencia de los genes asociados a la expresión de C (*hasAB* y *hasC*), FAP (*pauA*/*pauB*) y FU (*cfu*) mediante reacción en cadena de la polimerasa como así también la capacidad de internalización a células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T) en 8 cepas.

Se estudió la patogénesis temprana y respuesta inflamatoria mediante la inducción de mastitis experimental en 6 cabras por inoculación vía intramamaria de  $1,7 \times 10^8$  UFC/ml de la cepa *S. uberis* IR47 aislada de MC. La cepa está caracterizada por la expresión fenotípica de P y H, por poseer los genes de virulencia *hasAB/C* y *pauA*, y por presentar capacidad de internalización a las células MAC-T.

Durante el ensayo se detectó un incremento en el Recuento celular somático a las 8 hs., con un valor máximo de  $4,27 \times 10^6$  cél/ml a las 20 hs. Se identificó una reducción importante de bacterias en leche de  $10^7$  a  $10^4$  UFC/ml entre las 4 y 24 hs. pi. *S. uberis* fue hallado en el tejido de la glándula inoculada (GI) a las 8 hs. pi, con marcada reducción a las 24 hs. A las 16 hs pi se detectaron las lesiones histológicas más severas en el tejido de la GI. La cepa *S. uberis* IR47 fue detectada a las 12 hs pi en el lumen de los acinos secretorios e internalizada en las células epiteliales. La infección estuvo focalizada en la glándula mamaria y cedió gradualmente hacia las 24 hs. La cepa *S. uberis* IR 47 fue capaz de establecer una mastitis subclínica en cabras.

## ABSTRACT

*Streptococcus uberis* is world wide known as the most important environmental pathogen associated with clinical and subclinical mastitis in cows. In the present work the phenotypical and genotypical aspects of *S. uberis* strains were studied and the early pathogenesis caused by this bacterial species was described.

A total of 178 *Streptococcus* strains were isolated from milk samples. Samples were obtained from cows affected by Clinical (MC) and Subclinical (MS) mastitis of 18 different dairy farms in Cordoba, Santa Fe and Buenos Aires provinces. Among all investigated strains only 54 strains, 17 isolated from MC and 37 from MS, were classified as *S. uberis* by biochemical tests. The strains yielded twenty one different biochemical profiles showing a marked physiological variability in the species. A 76,5% MC strains and 81,1% MS strains were confirmed as *S. uberis* by the restriction fragment polymorphism analysis.

Capsule (C) production was demonstrated by *in vitro* study of virulence factors among the 43 strains of *S. uberis*, and it could be observed in a 60% of strains of both origins. Plasminogen activator factor (PAF) was detected in 84,7% of MC strains and 63% MS strains. Uberis factor (UF) was observed in 23% of all studied strains. Hyaluronidase (H) production was found in 62% of MC and MS strains. The 97,7% of isolated strains showed  $\alpha$ -haemolysis ( $\alpha$  H). Protease (P) production was identified in 69,2 % and 93,3 % of MC and MS strains respectively. Among 43 strains of *S. uberis*, 19 virulence profiles were recognized. A total of 14 genetic profiles out of 32 strains of *S. uberis* were obtained by pulsed field electrophoresis. In general terms, no relation was found among genotypical profiles, virulence profiles, origin and dairy farm.

The presence of genes associated with C expression (*hasAB* y *hasC*), PAF (*pauA/pauB*) and UF (*cfu*) by polymerase chain reaction and the ability for internalizing the epithelial cells of bovine mammalian gland (MAC-T) were studied for 8 strains.

Early pathogenesis and inflammatory response was studied by inducing experimental mastitis in 6 goats by intramammary inoculation of a  $1,7 \times 10^8$  UFC/ml inoculum of *S. uberis* strain IR47 isolated from MC. The strain is characterized by phenotypical expression of P, H and  $\alpha$ H, by having *hasAB/C* y *pauA* virulence genes and by presenting the ability to internalize MAC-T cells. During the assay, an increase of somatic cell count was observed at 8 h with a highest value up to  $4,27 \times 10^6$  cél/ml at 20 h post inoculation. An important decrease from  $10^7$  to  $10^4$  UFC/ml of bacteria in milk was detected between 4 and 24 h post inoculation.

*S. uberis* could be found in the tissue of the inoculated gland at 8 h after inoculation, with a progressively decreasing to 24 h. The severest histological lesions in the inoculated gland tissue were detected 16 h post inoculation. *S. uberis* strain IR47 was detected 12 h post inoculation in the lumen of the secretory alveoli and internalized into the epithelial cells. The infection was focused in the mammary gland and it gradually overcome 24 h post inoculation. *S. uberis* strain IR 47 was capable of establishing subclinical mastitis in goats.



*Indice*

## INDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	Mastitis bovina	1
1.1	Definición de mastitis	2
1.2.	Tipos de mastitis	3
1.2.1.	Mastitis clínica	3
1.2.2.	Mastitis subclínica	4
1.2.3.	Mastitis crónica	4
2.	Microorganismos productores de mastitis bovina	5
2.1.	Microorganismos contagiosos	5
2.2.	Microorganismos ambientales	6
2.3.	Otros microorganismos	7
3.	Género <i>Streptococcus</i>	7
3.1.	<i>Streptococcus uberis</i>	8
3.2.	Características de la mastitis producida por <i>S. uberis</i>	9
3.3.	Taxonomía	9
4.	Factores de virulencia	11
4.1.	Cápsula de ácido hialurónico	12
4.2.	Factor activador de plasminógeno	14
4.3.	Factor uberis	16
4.4.	Hialuronidasa	18
4.5.	Adherencia e Invasión a células epiteliales mamarias	19
4.6.	Otros factores de virulencia	20
4.6.1.	Toxina neutrofílica	20
4.6.2.	Proteína M-like	21
4.6.3.	Proteína SUAM	21
4.6.4.	GapC	22
5.	Genoma de <i>S. uberis</i>	23
5.1.	Identificación molecular a nivel de especie	23
5.2.	Genotipificación	24
6.	Modelos experimentales para el estudio de la patogénesis de mastitis a <i>S. uberis</i>	25
<b>II.</b>	<b>HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	<b>28</b>

III.	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	28
IV.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	28
V.	<b>MATERIALES</b>	30
1.	Cepas bacterianas	30
2.	Cebadores	30
3.	Marcadores de Peso Molecular	31
VI	<b>MÉTODOS</b>	31
1.	Aislamiento e Identificación Taxonómica de las cepas de <i>Streptococcus uberis</i>	31
1.1.	Obtención de las muestras	31
1.2.	Aislamiento de cepas de <i>Streptococcus</i>	31
1.3.	Morfología colonial	32
1.4.	Tinción de Gram	32
1.5.	Prueba de la catalasa	32
1.6.	Crecimiento en caldo NaCl al 6,5%	32
1.7.	Conservación de las cepas	32
1.8.	Recuperación de las cepas aisladas	33
1.9.	Identificación a nivel de especie	33
1.9. 1.	Pruebas convencionales	33
1.9.1.1	Prueba de Camp	33
1.9.1.2	Producción de amonio a partir de arginina	34
1.9.1.3	Hidrólisis del hipurato	34
1.9.1.4.	Hidrólisis de la esculina	34
1.9.1.5.	Fermentación de azúcares	34
1.9.1.6.	Crecimiento a 45°C	35
1.9. 2.	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	35
1.9.2.1	Extracción de ADN cromosomal	35
1.9.2.2	Amplificación del ADNr 16S	36
1.9.2.3.	Corte con enzimas de restricción y electroforesis	36
2.	Estudio de la expresión <i>in vitro</i> de factores de virulencia	39

2.1.	Determinación de cápsula	39
2.2.	Determinación de Factor Activador del Plasminógeno	39
2.3.	Determinación del factor iberis	39
2.4.	Determinación de hialuronidasa	40
2.5.	Determinación de proteasa	40
2.6.	Determinación de hemolisinas	41
3.	Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)	41
3.1.	Extracción de ADN cromosomal	41
3.2.	Digestión del ADN genómico y electroforesis	42
3.3.	Interpretación de los patrones de restricción del ADN genómico	43
3.4.	Análisis de los perfiles genotípicos	43
4.	Determinación de la presencia de genes de virulencia	44
4.1.	Extracción del ADN cromosomal	44
4.2.	Amplificación de los genes de virulencia.	44
4.3.	Programas de PCR	45
4.4.	Electroforesis en gel de agarosa	45
5.	Ensayo de adherencia e invasión a células epiteliales mamarias	46
5.1.	Cultivo bacteriano	46
5.2.	Células epiteliales mamarias bovinas	46
5.3.	Ensayo de internalización a células epiteliales mamarias	46
6.	Patogénesis temprana y respuesta inflamatoria inducida por <i>Streptococcus uberis</i> en cabras	47
6.1.	Recuento Celular Somático en cabras libres de infección Intramamaria	47
6.2.	Animales	48
6.3.	Preparación del inóculo	48
6.4.	Diseño del experimento	49
6.5.	Análisis de leche	50
6.5.1.	Recuento de células somáticas	50
6.5.2.	Recuento bacteriano total	50
6.5.3.	Recuento de <i>S. uberis</i>	51
6.6.	Análisis de sangre	51

6.6.1.	Recuento leucocitario total	52
6.6.2.	Formula relativa leucocitaria	52
6.7.	Examen clínico	52
6.8.	Muestras de tejidos para examen bacteriológico	52
6.9.	Muestras de tejido para histopatología e inmunohistoquímica	53
6.10.	Histopatología	53
6.11.	Inmunohistoquímica	54
6.11.1.	Obtención de anticuerpos específicos contra <i>S. uberis</i>	54
6.11.2.	Animales	54
6.11.3.	Preparación del antígeno	54
6.11.4.	Esquema de inmunización	55
6.11.5.	Obtención de suero inmune	55
6.11.6.	Técnica inmunohistoquímica	56
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
1.	Identificación a nivel de especie de cepas de <i>S. uberis</i> aisladas de mastitis clínica y subclínica	58
1.1	Bacteriología convencional	58
1.2.	Confirmación de las cepas de <i>S. uberis</i> por la técnica de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción	60
2.	Estudio de la expresión <i>in vitro</i> de factores de virulencia	65
2.1.	Cápsula.	65
2.2.	Producción del factor activador de plasminógeno	66
2.3.	Factor uberis	68
2.4.	Hialuronidasa	69
2.5.	Proteasa	71
2.6.	Producción de hemolisinas	72
2.7.	Perfiles de virulencia	74
3.	Electroforesis de campos pulsantes	76
3.1.	Análisis por taxonomía numérica	83
4.	Detección de genes de virulencia por la técnica de amplificación por PCR	84
4.1.	Determinación de genes asociados a virulencia	85

4.2.	Factor uberis	85
4.3.	Cápsula	87
4.4.	Factor Activador del Plasminógeno	91
5.	Ensayo de internalización a células epiteliales mamarias	93
6.	Estudio de la patogénesis temprana en mastitis experimental a <i>S. uberis</i> en cabras	95
6.1.	Selección de la cepa	95
6.2.	Animales	95
6.3.	Observaciones clínicas	96
6.4.	Cambios de la secreción láctea	97
6.5.	Determinación del umbral del Recuento de Células Somáticas	97
6.6.	Recuento de células somáticas	98
6.7.	Recuento de <i>S. uberis</i> en leche	100
6.8.	Análisis de sangre. Recuento de glóbulos blancos y determinación de la fórmula leucocitaria	101
6.9.	Relación entre RCS en leche de la glándula inoculada y recuento de glóbulos blancos totales	103
6.10.	Relación entre recuento bacteriano en muestras de leche y glóbulos blancos totales en sangre	104
6.11.	Examen bacteriológico de muestras de tejidos	105
6.12.	Patología	106
6.13.	Inmunohistoquímica	109
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>112</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>113</b>
<b>XI.</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>135</b>

## INDICE DE FIGURAS

Fig 1	Representación esquemática de los genes <i>hasA</i> , <i>hasB</i> y <i>hasC</i> en <i>S. uberis</i>	14
Fig 2	Representación esquemática de los genes <i>pauA</i> y <i>pauB</i> en <i>S. uberis</i> .	16
Fig 3	Identificación de especies de <i>Streptococcus</i> de origen bovino a partir de la digestión de los productos de amplificación correspondientes al ADNr 16S con las enzimas de restricción <i>HhaI</i> , <i>RsaI</i> y <i>MspI</i>	37
Fig 4	Productos de amplificación del ADNr 16S de cepas de <i>S. uberis</i> digerido con <i>HhaI</i>	61
Fig 5	Productos de amplificación del ADNr 16S de cepas de <i>S. uberis</i> digerido con <i>RsaI</i>	62
Fig 6	Tambos de la Cuenc Lechera Central	64
Fig 7	Observación microscópica de cápsula mediante la tinción de Anthony	65
Fig 8	Actividad caseinolítica por activación del plasminógeno a plasmina	67
Fig 9	Factor uberis	68
Fig 10	Producción de hialuronidasa	69
Fig 11	Producción de Proteasa en medio agarosa-leche	72
Fig 12	Producción de $\alpha$ hemólisis por cepas de <i>S. uberis</i>	73
Fig 13	Análisis por PFGE del ADN cromosomal digerido con <i>SmaI</i>	76
Fig 14	Análisis por PFGE de cepas de <i>S. uberis</i>	79
Fig 15	Análisis por PFGE de <i>S. uberis</i> .	80
Fig 16	Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGA basado en el coeficiente de Dice por la comparación de perfiles de PFGE de cepas de <i>S. uberis</i> con el origen, tambo, procedencia y perfil de virulencia	84
Fig 17	Producto de amplificación del gen <i>cfu</i> obtenido mediante PCR	

en cepas de <i>S. uberis</i> .	86
Fig 18 Producto de amplificación de <i>hasAB</i> y <i>hasC</i> de las Cepas de referencia	88
Fig 19 Productos de amplificación de <i>hasAB</i> ( I ) y del gen <i>hasC</i> ( II) obtenidos mediante PCR.	88
Fig 20 Producto de amplificación del gen <i>pauA</i> obtenido mediante PCR.	91
Fig 21 Internalización de <i>S. uberis</i> en células epiteliales mamarias bovinas MAC-T	94
Fig 22 Distribución del valor del RCS de leche de glándulas no infectadas (GNI) de 63 cabras, mediante el Soft SPSS, versión 10.10.	98
Fig 23 Recuento de células somáticas en leche	99
Fig 24 Recuento de Leucocitos (cél x 1000 / $\mu$ l) en sangre	102
Fig 25 Recuento de glóbulos blancos totales (cél/ $\mu$ l) en sangre y recuento de células somáticas (cél x 10 <sup>3</sup> /ml) en leche de glándulas inoculadas	104
Fig 26 Glándula mamaria de cabra (región central) inoculada con <i>S. uberis</i> .	107
Fig 27 Glándula mamaria de cabra (región distal) inoculada con <i>S. uberis</i> .	119





## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cebadores utilizados para la amplificación de los genes <i>pauA</i> , <i>pauB</i> , <i>cfu</i> , <i>hasA</i> , <i>hasB</i> y <i>hasC</i>	33
Tabla 2	Genes de virulencia y sus correspondientes números de acceso del GeneBank	44
Tabla 3	Programas de PCR para la amplificación de los genes <i>pauA</i> , <i>pauB</i> , <i>cfu</i> , <i>hasA</i> , <i>hasB</i> y <i>hasC</i>	45
Tabla 4	Perfiles bioquímicos presentes en cepas de <i>S. uberis</i>	59
Tabla 5	Cepas de <i>S. uberis</i> aisladas de mastitis clínica y subclínica	63
Tabla 6	Perfiles de virulencia en cepas de <i>S. uberis</i> de origen clínico y suclínico	75
Tabla 7	Naturaleza de la mastitis, origen, perfil de virulencia y perfil genético de cepas de <i>S. uberis</i> .	80
Tabla 8	Características de las cepas seleccionadas	85
Tabla 9	Características fenotípicas y genotípicas de las cepas seccionadas	87
Tabla 10	Genotipo y fenotipo capsular	90
Tabla 11	Recuento celular somático y Recuento bacteriano en leche de cabras inoculada con <i>S. uberis</i> IR 47.	100
Tabla 12	Recuento total y diferencial de glóbulos blancos en sangre periférica	103
Tabla 13	Recuento bacteriano en leche y en órganos de cada cabra en el momento de la eutanasia	105

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACE	Agar crecimiento estreptococo
ADH	Arginina-dihidrolasa
ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
AS	Agar sangre
ATCC	American type culture collection
ATS	Agar tripticase soya
Ca	Calcificación
CA	Córpora amilácea
CCE	Caldo crecimiento estreptococo
cel	Células
cm	Centímetro
csp	Cantidad suficiente para
CTH	Caldo Todd Hewitt
CTS	Caldo tripticase soya
d	Días
DAB	3,3'diaminobencidina tetrahydroclorato
DAB	Diaminobencidina tetrahydroclorato
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxitimidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
Dil	Dilución
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
EEO	Electroendósmosis
FAP	Factor activador de plasminógeno
FAyV	Facultad de Agronomía y Veterinaria
g	Gravedades
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenada
Gd	Glándula derecha
GI	Glándula inoculada
Gi	Glándula izquierda
GNI	Glándula no inoculada
h	Hora (s)
HE	Hematoxilina-Eosina
HP	Hemólisis parcial
HRP	Horseradish peroxidase
IHQ	Inmunohistoquímica
IIM	Infecciones intramamarias
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramos
Km	Kilómetro
LMP	Low melting point

Log	Logaritmo
M	Molar
mg	Miligramo (s)
MI	Multiplicidad de infección
min	Minuto (s)
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NC	No crecimiento
NCDO	National Collection of Dairy Organisms
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
NH	No hemólisis
p/v	Peso en volumen
PAL	Fosfatasa alcalina
PAP	Peroxidasa-antiperoxidasa
Pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reation
PFGE	Pulse field gel electrophoresis
pi	Post inoculación
PM	Peso molecular
RCS	Recuento celular somático
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDH	Deshidrogenasa de superficie estreptocócica
SDS	Sodium dodecil sulfato
SF	Solución fisiológica
TAE	Tris acetato EDTA
TBE	Tris borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TH	Tood Hewitt
Tiff	Tagged image file format
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPGMA	Unweighted Pair-Group Meted with Arithmetic Mean
US	Unidades secretoras
UV	Luz ultravioleta
V	Voltios
v/v	Volumen en volumen
VE	Volumen escaso
VP	Voges proskauer
µg	Microgramo (s)
µl	Microlitro (s)

# *Introducción*

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1. Mastitis bovina**

La mastitis bovina es considerada en todo el mundo como la enfermedad infecciosa de mayor importancia económica en la explotación lechera (Beck *et al.*, 1992, Sears *et al.*, 1993). Las grandes pérdidas económicas que ocasiona se deben a una marcada disminución en la producción, a una reducción en el valor biológico de la leche, como así también al aumento de los costos de producción. El reemplazo de vaquillonas, la presencia de antibióticos y drogas en la leche, los costos veterinarios, la labor extra y la pérdida de potencial genético del rodeo contribuyen con las pérdidas económicas ocasionadas por esta enfermedad (Mc Donald 1979; Philpot y Nickerson, 1993).

Estas pérdidas son importantes aún en países productores de leche que cuentan con tecnología de avanzada como Estados Unidos, Nueva Zelanda, Canadá, Reino Unido, entre otros (Ratafia, M., 1987). Resulta de interés destacar que debido al desconocimiento de la mastitis subclínica por parte de los productores, la capacidad potencial de producción en nuestro país se ve reducida en un 7% (Aba, L.. 2006).

En nuestro país las principales áreas de producción lechera están localizadas en las provincias de Córdoba (cuatro cuencas), Santa Fe (dos cuencas), Buenos Aires (cuatro cuencas), Entre Ríos (cuatro cuencas), La Pampa (una cuenca) y Tucumán (una cuenca). Las cuencas lecheras que abastecen cerca del 90% de la leche producida a nivel nacional, se encuentran en la región pampeana.

Las características de la producción primaria en Argentina ha sufrido grandes cambios en los últimos años. En el período 1988-2000 el número de tambos disminuyó en casi un 50% y sufrió una fuerte contracción adicional, entre los años 2000-2002. El menor número de tambos fue acompañado con un mayor tamaño de las explotaciones desde un promedio de 66 vacas/tambo hasta 161 vacas/tambo, en el mismo período. Asimismo, se registraron aumentos

significativos en la productividad e importantes mejoras en los patrones tecnológicos incorporados. La producción nacional de leche ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años, desde 636 millones de litros por año en 1991, hasta 9.817 millones en el 2000, con un descenso a 8.100 millones de litros en el 2002 (Gutman *et al.*, 2003).

En el año 2005 se observó una recuperación en la producción primaria, la cual alcanzó los 9.500 millones de litros ocupando el 16° lugar del ranking mundial de países productores de leche de vaca, con una participación del 1,8% en el total.

En el año 2006, la producción anual en nuestro país fue de 5.794 millones de litros (SAGPyA, 2007). El mejoramiento de la calidad de la leche y los derivados lácteos que se producen en el país es prioritario, teniendo en cuenta el potencial de la Argentina con relación a la capacidad exportadora del sector, principalmente en el marco del MERCOSUR. Entre enero y diciembre de 2007 se exportaron 878,2 Toneladas de leche fluida, equivalente a 5.103,3 mil dólares (SAGPyA, 2007). Además, son cada vez mayores las presiones del consumidor interno para el mejoramiento de la calidad de los productos (Bramley y Dodd, 1984; Booth, 1988; Reneau y Packard, 1991; González *et al.*, 2002).

### **1.1. Definición de mastitis**

La mastitis es una inflamación del parénquima de la glándula mamaria y representa la respuesta de los tejidos productores de leche a una injuria. Esta puede ser provocada por microorganismos o por diferentes factores, como lesiones traumáticas, disturbios secretorios de origen metabólico-nutricional, situaciones de estrés o cambios fisiológicos asociados con una terminación temprana de la lactancia (Philpot y Nickerson, 1993).

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial compleja que resulta de la interacción entre el hospedador, el medio ambiente y el patógeno, con diferentes grados de intensidad, variaciones en su duración y efectos residuales (Gonzalez *et al.*, 1980). Si bien la virulencia del microorganismo involucrado es un

factor importante en el establecimiento de la enfermedad, la susceptibilidad del animal a las infecciones, está determinado por una serie de características fisiológicas tales como, la configuración de la ubre y de los pezones, la selección genética, los mecanismos de defensa de la glándula, la edad del animal y el período de lactación o de secado en el que se encuentra la vaca (Mc Donald *et al.*, 1979).

Los factores del medio ambiente como el clima, las estaciones, la alimentación, estructura, manejo y limpieza del tambo, tamaño del rodeo, tipo de ordeño, condiciones de funcionamiento de la máquina ordeñadora, contribuyen a un aumento de la susceptibilidad de la glándula mamaria a las infecciones (Philpot y Nickerson, 1993, Hogan y Smith, 2003).

## **1.2. Tipos de mastitis**

### **1.2.1. Mastitis clínica**

La forma clínica se manifiesta en los cuartos mamarios con signos clínicos inflamatorios evidentes y produce cambios en la calidad de la leche que presenta modificaciones en sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas (sabor, consistencia y color) (Philpot y Nickerson, 1993 y Sears *et al.*, 1993).

Los signos clínicos son una expresión de los mecanismos de defensa del animal y pueden ser tanto locales como sistémicos. Los signos locales en cada glándula infectada comprenden enrojecimiento, calor, sensibilidad, firmeza aumentada y edema subcutáneo, disminución de la circulación sanguínea y eventual destrucción tisular de los cuartos infectados, mientras que los signos sistémicos incluyen anorexia, depresión, toxemia, temperatura corporal elevada y postración. La mayoría de las mastitis clínicas se presentan durante la lactancia, manifestándose casi el 60 % durante las primeras 6 semanas de este período (Mc Donald, 1984).

El diagnóstico se realiza a través de la palpación de la glándula mamaria y del análisis del aspecto macroscópico de la leche. En cualquier caso de mastitis clínica, la terapia antimicrobiana es siempre requerida (Mc Donald, 1984).

### **1.2.2. Mastitis subclínica**

El término subclínico se refiere a la inflamación de la glándula mamaria sin signos clínicos evidentes, aunque se logra su detección por aislamiento del germen patógeno y determinación de la presencia de un número elevado de células somáticas (macrófagos, neutrófilos, células epiteliales, etc.) (Sears *et al.*, 1993).

El tipo subclínico es 15 a 40 veces más frecuente que la manifestación clínica, usualmente la precede y es de larga duración. Las infecciones subclínicas pueden progresar como infecciones crónicas, porque son raramente detectadas por el productor. De este modo la glándula actúa como reservorio de agentes causantes de la enfermedad contribuyendo a pérdidas significativas en la producción y calidad de la leche. Por ello la detección de casos subclínicos resulta de fundamental importancia (Philpot y Nickerson 1993).

### **1.2.3. Mastitis crónica**

La forma crónica puede comenzar con mastitis clínica o subclínica y puede ser detectada con signos intermitentes de mastitis clínica. Tiene usualmente un desarrollo progresivo de tejido cicatrizante y muestra un cambio en el tamaño y forma de la glándula afectada, acompañado de pérdidas o reducción en la producción de leche (Philpot y Nickerson, 1993).

La mastitis clínica es reconocida mediante signos visibles de la ubre, mientras que, la forma subclínica de la enfermedad es reconocida por un incremento en el Recuento Celular Somático (RCS) en leche, debido al influjo de leucocitos. Este parámetro es un estimador adecuado para conocer el grado de



inflamación de la glándula mamaria. Valores superiores a 200.000 cel/ml son indicadores de mastitis subclínica en el ganado bovino. En los tambos nacionales el promedio de las células somáticas varía entre 340.000 y 380.000 cel/ml a lo largo del año (Aba L., 2006).

No ocurre lo mismo con el ganado caprino. Si bien, se han establecido criterios higiénicos y de calidad bacteriológica para leche de cabra en la Unión Europea, aún no está definido el valor umbral de células somáticas (Delgado, *et al.*; 2003). Aunque diversos autores coinciden en adoptar un umbral de  $10^6$  cél/ml (Contreras *et al.*, 1997; Delgado *et al.*; 2003), existen evidencias que muestran que la leche de cabras no infectadas pueden contener más de  $10^6$  cél/ml (Contreras *et al.*, 1999; White, 1999) y por ende, indicando que un valor elevado de RCS por si sólo no es indicador de infección en cabras.

No obstante, Mc Dougall *et al.* (2001) afirma que el RCS es el mejor índice de predicción del status de infección de la glándula a pesar del número de factores que lo afectan.

## **2. Microorganismos patógenos productores de mastitis bovina**

Si bien, existen causas no infecciosas que pueden desencadenar los mecanismos que caracterizan la respuesta inflamatoria, el 80 % de las mastitis son producidas por agentes infecciosos (Watts, 1988). De acuerdo a su hábitat y naturaleza patógena, los microorganismos pueden ser clasificados como microorganismos contagiosos o ambientales (Watts, 1988; Philpot y Nickerson, 1993).

### **2.1. Microorganismos contagiosos**

Los microorganismos contagiosos son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. (NMC, 2003).

Estos microorganismos se encuentran en la piel de la ubre y los pezones, y en el canal del pezón de las vacas infectadas, contribuyendo a la transmisión desde los cuartos infectados a los no infectados principalmente durante el ordeño. De esta manera, la fuente principal de estos microorganismos son las ubres infectadas de las vacas. Estos microorganismos se adaptan bien al crecimiento dentro de la ubre, usualmente comienzan con infecciones subclínicas de larga duración, que pueden persistir durante la lactancia y en lactaciones subsecuentes (Philpot y Nickerson, 1993).

Estos patógenos son controlados mediante la implementación de un plan de control de 5 puntos, basado en la desinfección post-ordeño del pezón, adecuado mantenimiento del equipo de ordeño, terapia basada en antibióticos con fines profiláctico-terapéuticos y descarte de las vacas con infecciones crónicas (Leigh, 1999a).

## **2.2. Microorganismos ambientales**

Los principales microorganismos reconocidos dentro de este grupo son *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli*, y especies de los géneros *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. (Philpot y Nickerson, 1993).

El principal reservorio de estos microorganismos se encuentra en los alrededores del establo, incluyendo la materia fecal, el suelo, el agua, los alimentos ensilados, los corrales y el material vegetal. Acceden al interior de la ubre en el intervalo entre ordeños (Philpot y Nickerson, 1993). Su amplia distribución en el medio ambiente y sus posibilidades de alcanzar el tejido glandular aumenta en condiciones de mala higiene, con ordeños realizados en ubres húmedas, con el uso de esponjas sucias y con camas inadecuadas (Giraudo y Busso, 1980).

Como consecuencia del éxito de la implementación de las estrategias de control sobre los patógenos contagiosos, diversos autores han demostrado un

cambio en la etiología de la enfermedad (Patchara *et al.*, 2001, Phuektes *et al.*, 2001). Desde un punto de vista ecológico, se ha propuesto que los patógenos ambientales ocupan el nicho dejado por los patógenos contagiosos, provocando un aumento de su prevalencia en las infecciones intramamarias (Patchara *et al.*, 2001).

### **2.3. Otros microorganismos**

Entre las especies bacterianas con mayor prevalencia aisladas de glándulas infectadas en la mayoría de los rodeos se encuentra *Corynebacterium bovis* y *Staphylococcus coagulasa* negativos.

Otros microorganismos usualmente causan infecciones esporádicas y afectan sólo una o pocas vacas dentro de un rodeo. Entre ellos se pueden mencionar *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, y especies de *Nocardia*, *Bacillus* y *Serratia* (NMC, 2003). En climas tropicales adquieren relevancia levaduras del género *Candida* y algas pertenecientes al género *Prototheca* (Casia Dos Santos y Marín, 2005).

### **3. Género *Streptococcus***

Los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus* se caracterizan por ser células esféricas u ovoides, de 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, dispuestas en cadenas o de a pares cuando crecen en medios líquidos. Gram positivos, usualmente inmóviles, no forman endosporas. Algunas especies son capsuladas. Son anaerobios facultativos, catalasa negativos y quimiorganótrofos, requieren medios nutricionales ricos para su crecimiento y algunos necesitan una atmósfera enriquecida en 5% de  $\text{CO}_2$ . Poseen metabolismo fermentativo con gran producción de ácido láctico, aunque sin gas. El crecimiento está usualmente restringido a temperaturas entre 25-45°C, con un óptimo a 37°C

El género *Streptococcus* ha sido descrito como el segundo agente etiológico causante de mastitis bovina (Tessi *et al.*, 1979; Giraudo y Busso, 1980, Mc Donald, 1984; Rivero *et al.*, 1984; Calvhino *et al.*; 1991; Aarestrup *et al.*; 1995).

Las especies con mayor frecuencia de aislamiento son *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, siendo esta última especie, responsable del 33% de los casos de mastitis clínica a nivel mundial en rodeos que aplican medidas de control y sanidad animal (Philpot y Nickerson 1993).

En la Argentina existe un reducido número de estudios dirigidos al relevamiento de especies estreptocócicas. En una investigación realizada en 6 establecimientos lecheros pertenecientes a la cuenca lechera central de nuestro país, la especie *S. uberis* fue aislada con una frecuencia del 25,5% a partir de 90 aislamientos de cocos Gram positivos, catalasa negativos de muestras de leche compuesta (Reinoso *et al.*, 2008)

### 3.1. *Streptococcus uberis*

En general, las estrategias de control de la mastitis no han provocado una reducción significativa de la incidencia de mastitis producidas por microorganismos ambientales como *S. uberis*. La mayoría de las investigaciones han informado sobre la identificación de múltiples cepas de *S. uberis* dentro de un rodeo (Bassegio *et al.*, 1997; Douglas *et al.*, 2000; Phuektes *et al.*, 2001). Así, estos resultados refuerzan la hipótesis que sostiene el origen ambiental de *S. uberis*.

Sin embargo, en otros estudios se ha descrito la infección de varios animales de un rodeo con la misma cepa de *S. uberis* (Jayarao *et al.*, 1993; Gillespie *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 1998; Zadoks y Schukken, 2003). Este comportamiento podría ser atribuido a la transmisión por vía contagiosa de un animal enfermo a un animal sano. Aunque también, podría ser consecuencia de una infección simultánea de múltiples vacas a partir de una misma fuente ambiental. Estas discrepancias se basan en diferencias en la virulencia de las cepas, a un manejo inapropiado del rodeo, o a una combinación de ambas.

Se podría esperar un éxito mayor de las medidas de control con una reducción significativa de la incidencia de mastitis provocadas por *S. uberis*, dejando de lado la simplificación de considerar a este microorganismo como patógeno ambiental, y admitiendo el comportamiento dual de *S. uberis* como patógeno ambiental y contagioso (Zadoks y Schkken, 2003).

### **3.2. Características de la mastitis producida por *S. uberis***

La enfermedad producida por *S. uberis* raramente es severa. Puede presentarse en forma crónica o subclínica con síntomas suaves, involucrando cambios en la secreción y tejido de la ubre. La forma clínica es más frecuente en la lactancia temprana (Mc Donald, 1984).

La tasa de nuevas infecciones es alta luego de la injuria del canal del pezón y durante la segunda mitad del período seco, especialmente en rodeos donde no se realiza terapia de secado a todas las vacas y dos semanas previas a la parición, aislándose este microorganismo en el calostro de vacas primíparas (Mc Donald, 1984). La susceptibilidad de la glándula a la infección por *S. uberis* aumenta a medida que el período seco progresa, pudiendo ser atribuido a la internalización del microorganismo en etapas tempranas de este período. Luego el pezón se hace más resistente a la penetración, pero la susceptibilidad de la glándula se acrecienta (Leigh, 1999). Las tasas más altas de infección se dan en vacas adultas durante el invierno o durante el período de lactación temprana.

### **3.3. Taxonomía**

La especie *Streptococcus uberis* asociada a mastitis bovina fue descrita por primera vez por Dernhofer (1932), la que mostraba similitud con los estreptococos piógenos. Fue Roguinsky (1972) quién estableció en base a propiedades fisiológicas, que las cepas de *S. uberis* constituyen una especie bien definida. Facklam (1977) clasificó al género *Streptococcus* en 4 grupos mayores,

*S. pyogenes*, *S. viridans*, *S. lactis* y *Enterococcus*. *S. uberis* fue incluido dentro de los estreptococos "viridans".

Schleifer y Kilpper, (1984) y Schleifer (1985), en una revisión taxonómica del género *Streptococcus*, reclasificaron a éste, en los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Posteriormente, Schleifer y Kilpper Batz (1987) subdividió al género *Streptococcus* en tres grupos, estreptococos piógenos, estreptococos orales y otros estreptococos. *S. uberis* junto a otras especies fue ubicado dentro de la categoría de otros estreptococos.

En base a la hibridación ADN-ADN, Garvie y Bramley (1979) y Collins *et al.* (1984), demostraron la existencia de 2 genotipos designados, *S. uberis* tipo I y tipo II. Según Hardie (1986), la taxonomía de *S. uberis* era insatisfactoria. La especie era bioquímica y serológicamente heterogénea

Luego de un análisis comparativo de la secuencia nucleotídica del RNA ribosomal 16S de *S. uberis* tipo I y II, Williams y Collins (1990), propusieron para el tipo II la designación de *S. parauberis*, una nueva especie.

Desde el punto de vista de la bioquímica, se puede observar una gran variabilidad entre las cepas. El crecimiento en inulina ha sido recomendado como test de rutina para la identificación de *S. uberis* (Hogan *et al.*, 1999; Fortin *et al.*, 2003). No obstante, Watts (1988) reportó que el 100% de las cepas de *S. uberis* analizadas no presentaban capacidad de fermentar inulina. Por otra parte Lammler (1991) y Devrise *et al* (1999) informaron que el 100% y el 98% respectivamente, daban resultados positivos frente a inulina. Khan *et al.*, 2003 y Odierno *et al.*, 2006 reportaron un 69% y 64% respectivamente de cepas con capacidad de utilizar la inulina. Por lo tanto los miembros de esta especie son altamente variables en cuanto a su bioquímica.

Se han realizado varios intentos para identificar a *S. uberis* mediante métodos serológicos. Entre ellos, la clasificación serológica de Lancefield en base a diferentes carbohidratos antigénicos de pared ha mostrado que algunas cepas reaccionan con antisueros específicos del grupo E, pero ocasionalmente con el grupo B, C, D, G, P y U. Por lo tanto, el empleo de la serología parece ser de poco

valor para la identificación de esta especie considerando la marcada heterogeneidad serológica de *S. uberis*.

La identificación a nivel de especie de microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus* involucrados en infecciones de la glándula mamaria bovina tiene gran importancia clínica y epidemiológica para un adecuado tratamiento terapéutico y adopción de medidas profilácticas para el control de la mastitis (Poutrel Ryniewics, 1984). En general, la identificación a nivel de especie de los patógenos de mastitis en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario está basada en el análisis de características fenotípicas mediante pruebas bioquímicas, serológicas o perfiles enzimáticos.

Sin embargo, los marcadores fenotípicos pueden variar su expresión bajo ciertas condiciones ambientales o de cultivo. De esta manera, cepas de una misma especie pueden presentar perfiles bioquímicos atípicos. Además las pruebas bioquímicas no permiten diferenciar *S. uberis* de *S. parauberis* (Facklam, 2002).

Por ello, los laboratorios de diagnóstico dedicados a la identificación de patógenos que causan mastitis han informado frecuentemente la incapacidad de identificar a nivel de especie entre el 1 y el 10% de los aislamientos pertenecientes al género *Streptococcus* y *Enterococcus*.

#### **4. Factores de virulencia**

Las cepas de las especies patógenas asociadas a mastitis, ponen en juego un conjunto de estrategias para acceder a la glándula mamaria, multiplicándose a un ritmo suficiente para prevenir su eliminación durante el ordeño, facilitar su adherencia a células epiteliales y posterior colonización de los tejidos. Por otra parte debe resistir a la acción bactericida de las células fagocíticas y favorecer así, su persistencia (Leigh, 1999; Chlatwal, 2002).

Entre los potenciales determinantes de virulencia identificados y caracterizados en cepas de *S. uberis*, se encuentran la cápsula de ácido

hialurónico, el factor activador de plasminógeno, el factor uberis, las proteínas M-like y R-like, la toxina neutrofílica, la hialuronidasa, y las proteínas de unión a componentes de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina y laminina, (Oliver *et al.*, 1998).

#### **4.1. Cápsula de ácido hialurónico**

La capacidad de ciertas bacterias para evadir la opsonización ha sido considerada como un importante factor de virulencia, y la presencia de polisacáridos capsulares en la superficie celular ha sido asociada a la resistencia a la fagocitosis (Almeida y Oliver, 1993).

Estudios dirigidos a profundizar el conocimiento de los factores de virulencia de *S. uberis* han descrito que la cápsula está constituida por ácido hialurónico (Matthews *et al.*, 1994a). El material capsular puede presentarse bajo una forma de alto peso molecular, asociado a la célula bacteriana, y una forma de bajo peso molecular, aparentemente liberada al medio ambiente.

El ácido hialurónico liberado bloquea los receptores Fc presentes en la superficie de las células con capacidad fagocítica, impidiendo la unión de anticuerpos opsónicos sobre la membrana de los fagocitos y, por lo tanto, la unión y engolfamiento de las bacterias opsonizadas. De esta forma, el material extracelular puede facilitar la supervivencia de cepas no capsuladas en la glándula mamaria (Oliver *et al.*, 1998).

Han sido propuestos dos mecanismos generales para explicar el rol de los polisacáridos capsulares en la resistencia bacteriana a la fagocitosis por los neutrófilos. La cápsula podría prevenir la unión a la célula bacteriana de factores opsónicos como anticuerpos o el complemento, y actuaría enmascarando antígenos de superficie.

En el segundo mecanismo propuesto, la cápsula sería permeable a los factores opsónicos, los cuales se unirían debajo de la superficie capsular conformando así una barrera que evita el contacto posterior entre las opsoninas y



los receptores presentes en las células fagocíticas (Leigh, 1999). Asimismo, la repulsión electrostática entre la membrana electronegativa de los fagocitos y el material capsular cargado negativamente, contribuyen al rol antifagocítico de la cápsula (Almeida y Oliver, 1993; Oliver *et al.*, 1998).

La presencia ubicua de ácido hialurónico en los mamíferos no permite que esta sustancia sea fácilmente detectada por el sistema de vigilancia inmunológica del huésped, y por lo tanto explica la baja capacidad antigénica de la cápsula de *S. uberis* y su reducida inducción de anticuerpos opsonicos.

Ward *et al.* (2001) han demostrado la presencia de un operón constituido por tres genes, *hasA*, *hasB* y *hasC* que codifican enzimas involucradas en la síntesis de este polisacárido capsular. El gen *hasA* codifica la enzima hialuronato sintetasa que cataliza el ensamble de ácido hialurónico a partir de ácido glucurónico y N-acetil glucosamina. El gen *hasB* codifica una enzima UDP-glucosa deshidrogenasa y el producto del tercer gen, *hasC* es una UDP-glucosa pirofosforilasa (Figura 1).

En el mencionado trabajo, los autores también demostraron una reducida resistencia a la fagocitosis de mutantes no capsuladas como resultado de la disrupción de los genes *hasA* y *hasC*. De esta manera, los estudios permitieron confirmar que estos genes son esenciales para la producción de cápsula de ácido hialurónico. Los hallazgos mostraron la correlación entre la producción de material capsular y la resistencia a la fagocitosis por los neutrófilos.

Field *et al.* (2003) informaron que el genotipo *hasABC* con capacidad de producir cápsula, fue el predominante entre las cepas de *S. uberis* aisladas de leche bovina, mientras que el genotipo *hasC*, incapaz de producir cápsula, mostró reducida frecuencia de aislamiento (10%). Así, los resultados permiten especular que la cápsula es relevante en el establecimiento de la infección intramamaria.



**Figura 1.** Representación esquemática de los genes *hasA*, *hasB* y *hasC* en *S. uberis*. Las flechas sin relleno representan la orientación de los genes. Los triángulos rellenos indican la orientación de los marcos de lectura abiertos (ORFs).

#### 4.2. Factor activador de plasminógeno

El plasminógeno, zimógeno de la plasmina, es activado mediante la ruptura de un enlace peptídico por la acción de activadores fisiológicos presentes en los mamíferos.

La plasmina, una serín proteasa, cumple una importante función en los procesos fisiológicos de los mamíferos, tales como la degradación de proteínas de la matriz extracelular, lisis de la fibrina, migración celular, entre otras.

No obstante, diversos microorganismos patógenos, han desarrollado activadores de plasminógeno para aprovechar la actividad plasmina del huésped. El activador de plasminógeno PauA es el primer activador de plasminógeno descrito en *S.uberis* con capacidad para activar el plasminógeno bovino, ovino y equino a plasmina, aunque incapaz de activar el plasminógeno porcino o humano.

Es secretado como una proteína madura con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, luego de la remoción de un péptido señal.

*S. uberis* presenta exigentes requerimientos nutricionales de aminoácidos, vitaminas y elementos trazas, y por ende, su carácter es auxotrófico. En particular, esta especie requiere entre 10 a 13 aminoácidos para crecer en un medio químicamente definido. Ante la ausencia de ciertos aminoácidos esenciales, el crecimiento de este microorganismo puede ser restablecido mediante la inclusión de hidrolizados de caseína al medio de cultivo (Ward *et al.*, 2003).

Por otro lado, Ward *et al.* (2003) propusieron que el crecimiento de *S. uberis* en leche residual y recién sintetizada deficiente en aminoácidos y péptidos podría ser atribuida a la habilidad para hidrolizar proteínas del hospedador.

La generación de plasmina permite la ruptura proteolítica de la fibrina y de proteínas del tejido conectivo, facilitando la penetración bacteriana de las barreras titulares y su diseminación en los tejidos circundantes a la infección. Por ello, los investigadores han atribuido a la proteína PauA un rol potencial en la colonización de la glándula mamaria (Rosey *et al.*, 1999; Leigh, 2004). Además la activación del plasminógeno endógeno presente en la leche, induciría la hidrólisis de la caseína y, de ese modo, la liberación de péptidos y aminoácidos contribuirían a la multiplicación de *S. uberis* en la glándula mamaria (Johnsen *et al.*, 1999). Asimismo, la unión de plasmina en la superficie bacteriana permitiría la disponibilidad de péptidos próximos a la célula (Lincoln y Leigh, 1998).

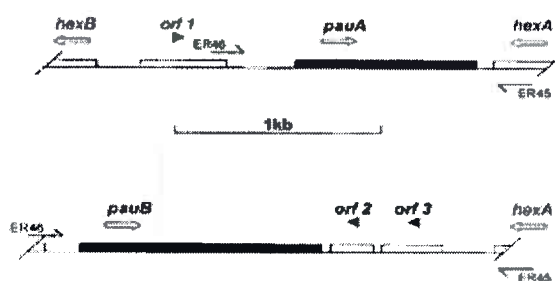
La proteína PauA está presente en la mayoría de las cepas de *S. uberis* aisladas de casos de mastitis clínica. Estudios realizados por Rosey *et al.* (1999) han informado que el gen *pauA* de dos cepas, una aislada de Estados Unidos y otra del Reino Unido, comparten un 99% de identidad en su secuencia, sugiriendo que el antígeno es altamente conservado entre las cepas (Figura 2).

Johnsen *et al.* (1999) identificaron un segundo activador del plasminógeno denominado PauB, con un peso molecular de 45 kDa, en la cepa SK880 de *S. uberis* aislada de un caso de mastitis clínica en Dinamarca. Más tarde, Ward y Leigh (2002) determinaron la ausencia del activador de plasminógeno PauA en esta cepa y comprobaron que el gen *pauB* ocupa el locus normalmente ocupado por PauA (Figura 2). Los autores demostraron su actividad sobre plasminógeno bovino, ovino, equino, caprino, porcino, de conejo y humano. Estudios futuros deberían confirmar si la aparente carencia de especificidad de especie de *pauB* podría ser debida a su secuencia primaria o quizás resulta de un mecanismo alternativo de activación (Ward y Leigh, 2002).

El gen *pauB* no fue hallado en cepas clínicas y subclínicas aisladas de 9 rodeos del Reino Unido ni en cepas de origen clínico de 20 rodeos de los Países

Bajos. Por lo tanto, PauB representa un nuevo activador de plasminógeno con amplia especificidad y de muy baja frecuencia.

La reducida distribución de *pauB* ha permitido sugerir la posibilidad que la adquisición de este gen por la cepa SK880 haya ocurrido recientemente. Por el contrario, se podría argumentar que la expresión de *pauB* confiere poca ventaja a la cepa, limitando así su diseminación (Ward y Leigh, 2002).



**Figura 2.** Representación esquemática de los genes *pauA* y *pauB* en *S. uberis*. Las flechas sin relleno representan la orientación de los genes. Los triángulos rellenos indican la orientación de los marcos de lectura abiertos (ORFs). Las flechas restantes indican la ubicación de los cebadores.

#### 4.3. Factor uberis

El factor CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) fue identificado por Christie *et al.* (1944) como responsable de un fenómeno hemolítico denominado reacción de CAMP, el cual ocurre cuando una estría de estreptococo del grupo B es sembrada en agar sangre de manera perpendicular a una estría de *Staphylococcus aureus*.

La reacción de CAMP consiste de dos pasos secuenciales. En el primer paso se produce la hidrólisis de la esfingomielina y de los fosfolípidos de la membrana por la esfingomielinasa o fosfolipasa ( $\beta$ -toxina) liberada por *S. aureus*.

En la segunda etapa, luego de la liberación de ceramidas, una proteína extracelular termoestable con actividad cohemolítica ó factor CAMP interactúa de

manera no enzimática con la membrana ya inestable y conduce a la lisis celular (Jiang *et al.*, 1996; Gase *et al.*, 1999).

Skalka y Smola (1981) describieron una exosustancia con actividad similar en *S. uberis* e informaron la muerte de conejos y ratones blancos por administración parenteral de esta proteína extracelular denominada factor uberis.

Si bien es similar a nivel químico con el factor CAMP presente en cepas de *S. agalactiae*, muestra diferencias en actividad, cinética y producción durante el ciclo de crecimiento. Esta exoproteína de 42 kDa (López *et al.*, 1995) presenta actividad lítica sobre eritrocitos bovinos y ovinos y puede ser detectada por su actividad sobre membranas artificiales previamente tratadas con fosfolipasa o esfingomielinasa (Jiang *et al.*, 1996).

Además de su presencia extracelular y actividad cohemolítica, la proteína CAMP se encuentra en la superficie de los microorganismos y se une mediante una reacción no inmune con la fracción Fc de las inmunoglobulinas G y M de diferentes orígenes (humanos, ratones, conejos y bovinos). Así, impediría la unión de anticuerpos opsónicos sobre la membrana de los fagocitos y, por ende, la unión y engolfamiento de las bacterias opsonizadas (Jurguens *et al.*, 1987).

Aunque el rol del factor CAMP en la patogénesis no ha sido dilucidado, varias investigaciones sugieren que la liberación de esta proteína puede afectar negativamente la respuesta inespecífica del hospedador, debido a un potencial rol antifagocítico. Se ha demostrado que una única inyección intravenosa de ésta proteína parcialmente purificada causa la muerte de conejos. Estas observaciones permiten especular sobre el rol potencial de la proteína CAMP en la patogénesis (Jurguens *et al.*, 1987).

Jiang *et al.* (1996) clonaron y secuenciaron el gen *cfu* responsable de la expresión de este factor en *S. uberis*, y determinaron la presencia del gen únicamente, en las cepas que presentaron reacción CAMP positiva y restringido a una pequeña proporción de las cepas.

#### 4.4. Hialuronidasa

La enzima hialuronidasa fue descrita por primera vez en *S. uberis* por Schaufuss *et al.*; en 1989. Los autores sugieren un rol destacado de la hialuronidasa en la diseminación de *S. uberis* en glándula mamaria, considerando su capacidad de hidrólisis del ácido hialurónico, un componente esencial del tejido conectivo (Schaufuss *et al.*; en 1989).

En bacterias Gram negativas, los disacáridos resultantes de la hidrólisis del ácido hialurónico, son transportados y metabolizados intracelularmente aportando nutrientes que contribuyen a la multiplicación y diseminación del patógeno (Hynes *et al.*; 2000). No obstante, los autores sugieren que la hialuronidasa podría contribuir en los microorganismos Gram positivos, tanto a la diseminación como a la proliferación bacteriana como consecuencia del aporte de nutrientes.

Sin embargo, en los estreptococos del Grupo A se ha planteado una paradoja debido a la producción de hialuronidasa y de una cápsula antifagocítica constituida por hialuronato. De esta manera, representa un “conflicto de intereses” desde un punto de vista racional, dado que la hialuronidasa producida degradaría la cápsula haciendo al microorganismo susceptible a la fagocitosis (Hynes *et al.*; 2000). La resistencia a la fagocitosis es un mecanismo inespecífico fundamental presente en los patógenos para evadir las defensas del huésped. Por ello, se ha propuesto en *S. pyogenes* un factor antifagocítico adicional, la proteína M, la que provee suficiente protección durante la producción de hialuronidasa (Hynes y Walton, 2001).

Crater y van de Rijn (1995), pusieron en evidencia el fenotipo acapsular en fase estacionaria en cepas capsuladas de *Streptococcus* Grupo A y ausencia de actividad de hialuronato sintetasa en membrana. Por lo tanto, este fenómeno sería la consecuencia de un mecanismo de regulación transcripcional, y no a la producción de hialuronidasa extracelular (Crater y van de Rijn., 1995).

#### 4.5. Adherencia e Invasión a células epiteliales mamarias

La adherencia de los patógenos asociados a mastitis a las células epiteliales es considerada un evento esencial para lograr una colonización exitosa de la glándula mamaria (Sutra y Poutrel, 1994). Así, evitan su eliminación mediante el proceso de barrido durante el ordeño y compiten por los nutrientes presentes en la superficie de las células del hospedador.

La adherencia es seguida rápidamente por la entrada del patógeno a las células ocupando el medio ambiente intracelular donde no están presentes las células fagocíticas, anticuerpos y factores antimicrobianos. Para alcanzar la internalización, los patógenos inducen su propia adsorción al activar receptores en la célula hospedadora, proceso que dispara cambios en su superficie, llevando al engolfamiento e internalización del patógeno adherido.

En la adherencia de *S. uberis* están involucradas proteínas de la superficie bacteriana con afinidad por factores del hospedador. Entre ellas, han sido reconocidas proteínas, tales como, proteína semejante a la proteína M (*M like*), proteínas de unión a lactoferrina, proteínas de unión a colágeno. Además, Almeida *et al.*, (1999a y 1999b) sugieren la existencia de otras estructuras presentes en la superficie bacteriana que usan proteínas de la matriz extracelular como moléculas puente para realzar la adherencia de *S. uberis* a las células epiteliales. Entre ellas, se han identificado a proteoglicanos y glicosaminglicanos, como así también a proteínas presentes en leche.

En la célula epitelial, el proceso de internalización requiere de energía metabólica, de un citoesqueleto funcional y de un sistema de transducción de señales, mediado por tirosina quinasa y proteína C quinasa (Almeida, 2000). Además, los patógenos requieren de proteínas específicas para su internalización al citoplasma, y por ende, presentan una síntesis activa de proteínas (Matthews *et al.*, 1994b; Almeida y Oliver, 1995; Almeida, 1996; Almeida y Oliver, 2001b). Así, el patógeno alcanza su propia internalización y se encuentra en un medio ambiente seguro. Esto, puede permitir la diseminación del patógeno a células vecinas, o la

bacteria puede permanecer en el citoplasma, resultando en infecciones persistentes. Además, la unión a factores del hospedador es usado para enmascarar sitios específicos en su superficie, evitando la unión de anticuerpos, e impidiendo su engolfamiento y muerte por las células fagocíticas (Almeida, 2000; Almeida, 2001b).

Estudios de microscopía electrónica realizados en *S. uberis* han mostrado cambios en la membrana de la célula hospedadora con formación de pseudópodos y vacuola, y una supervivencia intracelular de hasta 120 h (Matthews, 1994). Sin embargo, dentro de las 24 h el patógeno no fue encontrado en el interior de las vacuolas, sino en forma libre en el citosol de la célula hospedadora.

Las investigaciones realizadas por Almeida (2006) demuestran que el tráfico intracelular de *S. uberis* consiste en un mecanismo dependiente de invaginaciones de la membrana citoplasmática (caveola), el cual está desacoplado de la acidificación del endosoma y de la fusión del endosoma-lisosoma. Esta estrategia permitiría explicar la persistencia intracelular de *S. uberis* sin causar daño a las células.

En *S. uberis*, se ha demostrado no sólo la internalización de las células epiteliales mamarias, sino también su capacidad para salir a través de la membrana basolateral con posterior adherencia e internalización en las células epiteliales subyacentes. De esta manera, se comprende el hallazgo de zonas focales profundas de infección bacteriana activa detectada en casos de mastitis crónica (Almeida *et al.*; 1994; Almeida y Oliver, 1995).

#### **4.6. Otros factores de virulencia**

##### **4.6.1. Toxina neutrofílica**

Leigh (1994b) propuso que la capacidad de resistir a la fagocitosis por los neutrófilos de las cepas de *S. uberis* capsuladas era debido a una molécula, de



500 a 1000 Da no antigénica, termoestable y resistente a la actividad de proteasas, que podría inhibir o lisar a dichas células. Tal molécula parece ser producida por las cepas capsuladas y permanecería retenida en la matriz capsular.

#### 4.6.2. Proteína *M-like*

La proteína M ejerce una función antifagocítica a través de la unión a proteínas de la matriz extracelular, fibronectina, fibrinógeno y albúmina bovina, enmascarando epitopes bacterianos. De esta manera, bloquea la deposición de opsoninas sobre la superficie bacteriana y por ende, el reconocimiento por los macrófagos del huésped (Almeida *et al.*, 1996; Almeida *et al.*; 2005).

#### 4.6.3. Proteína SUAM

La lactoferrina, glicoproteína de unión a hierro, presente en secreciones biológicas, leche y leucocitos, representa uno de los mecanismos inespecíficos antibacterianos a través del secuestro de hierro del medio ambiente.

Investigaciones realizadas en 5 cepas de *S. uberis* crecidas en leche han puesto en evidencia al menos dos proteínas de superficie involucradas en la unión a lactoferrina, (Lbp, lactoferrin binding protein). Esta interacción podría tener importantes implicancias en la patogénesis de la mastitis bovina posibilitando la adquisición de hierro para su crecimiento (Fang y Oliver, 1999). Sin embargo, Moshynskyy *et al.* (2003) informan que tanto una mutante isogénica, que carece de la secuencia interna del gen *lbp*, como la cepa parental, incorporan niveles similares de hierro.

Por otro lado, Fang *et al.* (2000) han sugerido que la Lbp cumple un rol de molécula de unión entre *S. uberis* y las células epiteliales mamarias bovinas, facilitando su adherencia. Sin embargo, Moshynskyy *et al.* (2003) informan que la

Lbp no es responsable de la adherencia de *S. uberis* a las células epiteliales del huésped.

Sin embargo, Almeida et al. (2006) han identificado una proteína bacteriana denominada SUAM (Molécula de Adhesión de *Streptococcus uberis*), idéntica en masa molecular y afinidad por la lactoferrina a una de las descritas por Oliver et al (1998) y Fang et al (2000) y Los autores proponen que es una molécula de adhesión con afinidad por la lactoferrina, involucrada en la adherencia e internalización de *S. uberis* a las células epiteliales mamarias bovinas (Oliver et al., 2004, Almeida et al., 2006).

#### 4.6.4 GapC

Dentro de las proteínas de superficie, *S. uberis* posee una enzima con actividad gliceraldehído fosfato deshidrogenada (GAPDH), inicialmente descrita en estreptococos del grupo A. como deshidrogenasa de superficie estreptocócica (SDH), también llamada GapC. Esta proteína presenta múltiples actividades además de intervenir en el metabolismo de la glucosa en la fosforilación del gliceraldehído 3-P a ácido 1-3 difosfoglicérico.

Al igual que la proteína SDH de *S. pyogenes*, las proteínas GapC identificadas en *S. uberis*, *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae* con actividad GAPDH, presentan elevada homología y están ubicadas en la superficie de la bacteria y unen plasmina. La proteína SDH de *S. pyogenes* muestra además actividad de ADP ribosilación, la cual afecta la transcripción de la célula hospedadora y realiza la patogénesis de la enfermedad.

El gen *gapC* de *S. uberis* ha sido clonado y secuenciado, y la vacunación de vacas lactantes con la proteína GapC de *S. uberis* ha resultado en una protección significativa frente al desafío heterólogo dado que el RCS no incrementó significativamente. (Fontaine et al., 2002).

Además, se ha demostrado que una proteína quimérica construida a partir de la región conservada de la proteína GapC de *S. uberis*, y de regiones no

conservadas de *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae*, mantiene la actividad enzimática de la proteína GapC de *S. uberis*. De esta manera, podría ser usado para la protección contra la mastitis causada por estreptococos contagiosos y ambientales (Pérez Casal *et al.*, 2004).

## 5. Genoma de *S. uberis*

El genoma de *S. uberis*, secuenciado en su totalidad, resulta un recurso de gran valor en la identificación a nivel de especie, en la discriminación entre cepas de la especie como así también, en la detección de genes responsables de la expresión de determinantes de virulencia ([http://www.sanger.ac.uk/projects/s\\_uberis/](http://www.sanger.ac.uk/projects/s_uberis/)).

### 5.1. Identificación molecular a nivel de especie

El desarrollo y aplicación de técnicas diagnósticas basadas en los ácidos nucleicos ha permitido una identificación más adecuada (Jayarao, 1992; Bentley y Leigh, 1995), atribuida a la menor variabilidad en la composición del material genético con relación a la presentada por los productos que éste codifica (Gillespie *et al.*, 1997).

Una de las moléculas más apropiadas para estos estudios es la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (16S ARNr), presente en células en activo crecimiento en un elevado número de copias y con algunas regiones de la molécula altamente conservadas e intercaladas con regiones variables (Bentley y Leigh, 1995).

Un sistema de tipificación molecular basado en el estudio del ADN que codifica el ARNr mediante la técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) ha sido investigado en una variedad de microorganismos. Se ha demostrado que el análisis de patrones de restricción del ARNr puede ser una herramienta útil para distinguir entre cepas de una misma

especie, subespecie u otro nivel, dependiendo del grado de heterogeneidad genómica.

Aunque las cepas de *S. uberis* presentan heterogeneidad serológica y bioquímica, muestran idénticos polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de los genes del ARNr amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Jayarao *et al.*, 1991; Bentley y Leigh, 1995). Este método es de fácil desarrollo e interpretación, tiene un moderado costo, adecuado poder de discriminación y una buena reproducibilidad dentro de un laboratorio, como entre laboratorios (Olive y Bean, 1999).

## **5.2. Genotipificación**

Se conoce un número de técnicas convencionales de tipificación para diferenciar cepas de *S. uberis*, basadas en la susceptibilidad a antibióticos, fagos, y reacción frente a sueros específicos. Sin embargo, entre los métodos basados en el ADN, el análisis por macrorrestricción del ADN por electroforesis de campos pulsados (PFGE) es a menudo considerado el estándar de oro. Se caracteriza por ser una técnica con elevado poder discriminatorio, que produce perfiles distintos, fáciles de interpretar y reproducibles, aunque posee la desventaja de ser laboriosa, de costo elevado y que demanda más tiempo con relación a otras técnicas moleculares (Tenover *et al.*, 1995; Olive y Bean, 1999). Constituye una herramienta esencial para establecer el origen clonal de los aislados bacterianos, contribuyendo a establecer relaciones epidemiológicas entre cepas de una misma especie, aisladas de un rodeo o de diferentes rodeos. La preponderancia de un determinado perfil genético permite conocer la distribución de determinada cepa con capacidad infectiva y especular acerca de la detección de clones con mayor virulencia.

## 6. Modelos experimentales para el estudio de la patogénesis de la mastitis a *S.uberis*

Desde hace varias décadas la patogenia bacteriana es estudiada en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, se cuenta con reducido número de estudios *in vivo* realizados para corroborar los hallazgos *in vitro*.

Para develar la base de la interacción, hospedador-patógeno se han desarrollado varios modelos animales en función de sus ventajas experimentales, es decir, bajo costo, facilidad de mantenimiento, similitud al hospedador natural. Otra característica preferida para cualquier modelo es el conocimiento acerca de su biología que permita monitorear y evaluar cambios tras el desafío con un agente patógeno (García-Lara *et al.*, 2005)

Estos modelos intentan reproducir el medio ambiente específico encontrado en el hospedador, y representan una alternativa para el estudio de los factores de virulencia de las bacterias patógenas (Almeida *et al.*, 2004).

Desde comienzos del decenio de 1960 los conejos, ratas y ratones han sido utilizados para determinar diversos aspectos de las características fisiopatológicas, y de las respuestas inmunológicas durante las infecciones estafilococales en diferentes órganos y sistemas (García-Lara *et al.*, 2005).

Ciertos animales son particularmente utilizados como modelos, como es el caso del ratón, para el estudio de mastitis infecciosa a *S. aureus* (Chandler; 1970). Desde entonces, este modelo se ha utilizado para evaluar la fisiopatología de las infecciones intramamarias (IIM) provocadas por *S. aureus* (Anderson, 1976 y 1978; Reid *et al.* 1976 ; Chandler *et al.*, 1980; Brouillette *et al.*, 2003a) y el rol de los potenciales factores de virulencia bacteriana (Jonsson *et al.*, 1985; Brouillette *et al.*, 2003b Almeida *et al.*, 2004).

Si bien ciertos modelos animales reproducen patologías como la mastitis, en apariencia similar a las registradas en bovinos, un conjunto de datos citológicos e inmunológicos demuestran frecuentemente que son poco representativos de lo que ocurre en el bovino. Por ello, son restrictivos y todas las conclusiones de las experimentaciones sobre esos modelos serán interpretadas con precauciones y

sin realizar extrapolaciones rápidas a la infección en el hospedador natural (Brouillete *et al.*, 2004 ).

En el caso de *S. uberis*, el modelo ideal sería el bovino, la especie animal donde se desarrolla preferencialmente esta especie bacteriana. Un reducido número de investigaciones han evaluado la patogénesis de la mastitis provocada por *S. uberis* en bovinos (McDonald y Anderson, 1981; Thomas *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 1998; Pedersen *et al.*, 2003, Rambeaud *et al.*, 2003; Almeida, 2004; Bannerman *et al.*, 2005). La mayoría de los estudios experimentales demostraron la inducción con éxito de mastitis clínica luego de inoculación intramamaria, realizada en vacas lactantes principalmente. El progreso de la mastitis se monitoreó mediante la evolución de diferentes parámetros en sangre y en leche como de los cambios histológicos en el tejido mamario.

A pesar de las incuestionables ventajas en el uso de los mamíferos para los estudios de patogénesis, el modelo bovino no resulta un modelo accesible. El uso de un gran número de mamíferos es difícil por razones logísticas, éticas y financieras, y un número adecuado es crítico a nivel estadístico para superar la variabilidad intrínseca de los modelos *in vivo* (García-Lara *et al.*, 2005).

De allí el interés por encontrar un modelo *in vivo* alternativo adecuado, sensible y apropiado. La cabra resulta una opción, dado que es menos costosa y el modelo permite el estudio de proteínas de la leche y del suero, la interacción del patógeno con células mamarias del hospedador y con los componentes inmune presentes o reclutados durante la infección. Además, el canal del pezón y la glándula mamaria de las cabras presentan la ventaja de ser más grandes con relación a la de los ratones (Brouillete *et al.*, 2005).

En última instancia, y obviamente, la característica clave para cualquier hospedador para calificar como un modelo de la patogénesis bacteriana es responder al agente infeccioso de una manera similar al hospedador para el cual es modelado. La validez de un par, agente patógeno-hospedador como modelo debe ser proporcionado por el escrutinio comparativo de los resultados para un

determinado agente patógeno en varios hospedadores, incluyendo su hospedador natural (García-Lara *et al.*, 2005).



*Objetivos*



## II. HIPOTESIS DE TRABAJO

La patogenicidad de *Streptococcus uberis* ha sido atribuida a potenciales determinantes de virulencia. Una amplia variedad de cepas han sido asociadas con mastitis clínica. Por ende, se podría hipotetizar que las cepas de *S. uberis* productoras de determinados factores de virulencia inducen mastitis en la glándula mamaria de cabras.

## III. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este plan de trabajo está dirigido a profundizar en el conocimiento de aspectos fenotípicos y genotípicos de *Streptococcus uberis*, con énfasis en la identificación a nivel de especie, en los factores de virulencia como así también en la patogénesis de la mastitis provocada por esta especie bacteriana.

## IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar cepas de *Streptococcus uberis* mediante métodos bacteriológicos convencionales a partir de cocos Gram positivos catalasa negativos, aislados de muestras de leche de mastitis clínica y subclínica de tambos de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires.
- 2.- Confirmar por técnicas moleculares la identidad de las cepas de *S. uberis* caracterizadas por pruebas bacteriológicas convencionales
- 3.- Investigar la expresión *in vitro* de los factores de virulencia en las cepas de *S. uberis*.

- 4.- Determinar la posible correlación entre los perfiles de virulencia, origen de las cepas, tambos de procedencia y perfiles genotípicos
- 5.- Determinar la presencia de genes asociados a la virulencia mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa
- 6.- Estudiar la capacidad de invasión a una línea celular de epitelio mamario bovino (MAC-T)
- 7.- Conocer la respuesta inflamatoria temprana inducida por inoculación intramamaria en cabras.



## *Materiales y Métodos*

## V. MATERIALES

### 1. Cepas bacterianas

- S. dysgalactiae* ATCC 27957, provista por Dr. Gottschalk (Canadá)
- S. uberis* ATCC 19436, provista por Dr. Gottschalk (Canadá)
- S. uberis* UT101, *S. uberis* UT 102, provistas por el Dr. Calvinho (Rafaela)
- S. uberis* NCDO 2038 provista por el Dr. Lammler (Alemania)
- S. bovis* ATCC 9809, provista por Dr. Gottschalk (Canadá)
- S. bovis* ATCC 27960, ATCC 27968, provistas por Dr Jayarao (USA)
- S. agalactiae* ATCC 3530, provista por Dr. Gottschalk (Canadá)
- Enterococcus faecalis* ATCC 19433 provista por Dr Gottschalk (Canadá)
- Staphylococcus aureus* RC8, cepa productora de  $\beta$ -hemolisina, aislada de un caso de mastitis subclínica de un tambo de la Provincia de Córdoba.
- Staphylococcus aureus* ISP479C, derivada de *S. aureus* 8325-4, productora de exoproteínas y curada del plásmido pl258::Tn 551.

### 2. Cebadores

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes *pauA*, *pauB*, *cfu* *hasA*, *hasB* y *hasC*

Gen <i>pauA/pauB</i>	<i>HexA</i> 5' – GAG ATT CCT CTC TAG ATA TCA- 3' orf1 5'-GGG CTG CAG ATC CGT TAA AAA ATG ACA TTA ATA T- 3'
Gen <i>cfu</i>	5'-CTT TAT TTT CCC CAA -3' 5' -ATT TCT TGG TCA ACT TG T -3'
Gen <i>hasA</i>	5' - GAA AGG TCT GAT GCT GAT - 3' 5' - TCA TCC CCT ATG CTT ACA G - 3'

---

Gen *hasB*            5' - TCT AGA CGC CGA TCA AGC -3'  
                              5' - TGA ATT CCY ATG CGT CGA TC -3

---

Gen *hasC*            5'-TGC TTG GTG ACG ATT TGA TG 3'  
                              5' -GTC CAA TGA TAG CAA GGT ACAC- 3'

---

### 3. Marcadores de Peso Molecular

Marcador 1 kb: 0,1 µg/µl (Promega)

Marcador 100 pb: 0,13 µg/µl (Biodynamics)

Fago Lamda 555 µg/ml.

## VI. MÉTODOS

### 1. Aislamiento e Identificación Taxonómica de las cepas de *Streptococcus uberis*

#### 1.1. Obtención de las muestras

Un volumen de 3-5 ml de muestra de leche total fue recolectado en tubo tapa a rosca estéril, luego de desinfectar los esfinteres de los pezones con alcohol y descartar los primeros chorros. Las muestras provenientes de 18 tambos ubicados en las Provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, se mantuvieron refrigeradas a 4°C dentro de las 24 horas posteriores a la recolección hasta su procesamiento bacteriológico (Odierno *et al.*, 2006).

#### 1.2. Aislamiento de cepas de *Streptococcus*

Las muestras se llevaron a temperatura ambiente, se homogeneizaron y se realizó el aislamiento por siembra de 10µl de leche con ansa estéril en agar sangre ovino 5% (AS). La identificación preliminar se realizó en base a la morfología

colonial, coloración de Gram, prueba de catalasa y crecimiento en NaCl. Aquellas colonias de cocos Gram positivos en cadenas, catalasa y crecimiento en NaCl negativos se conservaron para su análisis posterior (Odierno *et al* , 2006).

### 1.3. Morfología colonial

Se observó visualmente el aspecto macroscópico de las colonias. Fueron seleccionadas como presuntos estreptococos, aquellas colonias de pequeño tamaño (1-2 mm), translúcidas, convexas y húmedas.

### 1.4. Tinción de Gram

La observación al microscopio de cocos Gram positivos dispuestos de a pares o en cadena, de menos de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, presupone la presencia de microorganismos del género *Streptococcus*.

### 1.5. Prueba de la catalasa

La emulsión de una colonia de un cultivo de 24 h en una gota de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% sobre un portaobjetos limpio permitió determinar la producción de catalasa. La formación de burbujas por liberación de  $\text{O}_2$  fue registrada como resultado positivo, mientras que su ausencia indicó un resultado negativo (Odierno *et al* , 2006).

### 1.6. Crecimiento en caldo NaCl al 6,5%

Se realizó por siembra de una colonia en 2 ml de caldo NaCl al 6,5% y posterior incubación durante 24 h. a 37°C. El viraje del medio de violeta a amarillo fue registrado como resultado positivo (Finegold y Baron, 1989).

### 1.7. Conservación de las cepas.

A partir de un cultivo de 24 h en AS, colonias aisladas fueron resuspendidas en 1 ml de medio conteniendo CCE - glicerol 20% y conservadas a -80°C para su posterior análisis.

## 1.8. Recuperación de las cepas

Las cepas fueron recuperadas por siembra de 5 µl del congelado en AS. En caso de no obtener crecimiento, se suspendió un volumen de 100 µl del congelado en 2 ml de CCE, procediendo luego a la siembra en AS.

## 1.9. Identificación a nivel de especie

### 1.9.1. Pruebas convencionales

De todos los aislamientos cocos Gram positivos catalasa negativos, se procedió a diferenciar las cepas de enterococos de los estreptococos por su capacidad de crecer ó no en caldo NaCl al 6,5%, respectivamente. La identificación bacteriológica de las cepas de estreptococos aisladas se realizó según el esquema taxonómico diseñado en el laboratorio, en base a las pruebas fisiológicas seleccionadas y detalladas a continuación: prueba de Camp, producción de amonio a partir de arginina, reducción del hipurato, utilización de distintos azúcares (inulina, manitol, sorbitol, rafinosa, salicina), hidrólisis de la esculina y crecimiento a 45°C.

Una cepa de campo fue identificada como perteneciente a una especie cuando al menos 7 de las 10 pruebas fisiológicas coinciden con los resultados obtenidos para la cepa de referencia, y si difieren en al menos dos caracteres con relación a las restantes cepas de referencia (Odierno *et al.*, 2006).

#### 1.9.1.1. Prueba de Camp

La determinación de la producción del factor Camp se realizó por siembra de los cultivos de *Streptococcus* a identificar, de manera perpendicular a una estría de *Staphylococcus aureus*, productor de β-hemolisina, en placas de agar sangre. Se consideró positivo la presencia de una zona de hemólisis total con forma de punta de flecha en el área de difusión de la hemolisina estafilocócica y de la proteína estreptocócica (Hogan *et al.*, 1999).

#### 1.9.1.2. Producción de amonio a partir de arginina

La determinación de la producción de amonio a partir de arginina se realizó por siembra de una colonia en 1,5 ml de caldo arginina, seguida de incubación a 37°C durante 24 h y posterior adición de 0,5 ml de reactivo de Nessler. Un resultado positivo fue registrado por viraje del medio a un color amarillo fuerte o naranja (Finegold y Baron, 1989).

#### 1.9.1.3. Hidrólisis del hipurato

La determinación de la prueba de reducción del hipurato se realizó por siembra de una colonia en 0,4 ml de la solución de hipurato, seguida de incubación a 37°C durante 24 h y posterior adición de dos gotas de la solución de ninhidrina. Un resultado positivo fue registrado por viraje de color de la solución transparente a violeta-púrpura (Buchanan y Gibbons, 1986; Finegold y Baron, 1989).

#### 1.9.1.4. Hidrólisis de la esculina

La determinación de la prueba de la hidrólisis de la esculina se realizó por siembra de una colonia en caldo esculina y posterior incubación a 37°C durante 24 h. El viraje del medio a un color marrón oscuro se consideró resultado positivo (McDonald *et al.*, 1976b; Hogan *et al* 1999;).

#### 1.9.1.5. Fermentación de azúcares

La utilización de azúcares se realizó por siembra de una colonia en caldo básico Rojo de Fenol suplementado con 1% del azúcar ensayado. Se incubó durante 7 días antes de registrar un resultado como negativo. La observación de turbidez con viraje del medio de naranja rojizo a amarillo se consideró resultado positivo, mientras que la reacción negativa se interpretó cuando el medio con turbidez viraba al rosado-fucsia (Odierno *et al.*, 2006).



#### 1.9.1.6. Crecimiento a 45°C

La determinación de crecimiento a 45°C se realizó por siembra de una colonia en 2 ml de CCE y posterior incubación durante 24 h a 45°C. Un resultado positivo fue registrado por detección de turbidez en el medio (Finegold y Baron, 1989).

### 1.9. 2. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

#### 1.9.2.1. Extracción de ADN cromosomal

Las bacterias crecidas en AS durante 18 h a 37°C fueron recogidas con hisopo estéril y resuspendidas en 1 ml de buffer TE<sup>3</sup>. El precipitado obtenido por centrifugación de la suspensión bacteriana a 7000 rpm durante 5 min. fue resuspendido en 350 µl de buffer TE<sup>3</sup>. Las bacterias fueron tratadas con 20 µl de lisozima durante 30 min. a 37°C y luego lisadas con 20 µl de SDS/Tris/EDTA, 3 µl de Proteinasa K y 3 µl de RNAsa por incubación durante 1 h a 37°C. La precipitación de proteínas fue realizada con la adición de 200 µl de NaCl 5 M seguida por 15 s de agitación y posterior centrifugación a 7000 rpm durante 5 min.

El sobrenadante extraído fue mezclado con 200 µl de Tris-fenol y 200 µl de Cloroformo-alcohol isoamílico. La fase acuosa superior fue extraída por centrifugación durante 10 min. a 7000 rpm. El ADN fue precipitado por el agregado de 2,5 volúmenes de etanol 100% y 30 µl de acetato de sodio 1 M seguido de una incubación durante 2 h a -20°C. El ADN resultante fue obtenido por centrifugación a 14000 rpm durante 5 min, secado en estufa a 37°C y resuspensión en 30 µl de buffer TE<sup>2</sup> (punto 5, Sección Materiales). Los ADNs fueron conservados a -20°C.

La cuantificación del ADN fue realizada por visualización en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1x teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml). En el gel se sembró 2 µl de una dilución 1/1000 del Fago Lamda como marcador de peso molecular y 1µl de cada muestra de ADN. En cada caso se adicionó 1 µl de

buffer muestra 6x y se llevó a un volumen final de 10 µl con buffer TE<sup>2</sup>. La electroforesis fue llevada a cabo durante 1 h a 65 V (Jayarao *et al.*, 1992).

#### 1.9.2.2. Amplificación del ADNr 16S

Las reacciones de amplificación se realizaron por mezcla de 10 µl de buffer Taq 10x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,5 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP y 2,5 U Taq en un volumen final de 100 µl. En todas las reacciones se realizó un control negativo, colocando en un tubo todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el ADN, el cual fue reemplazado por un volumen igual de agua.

La amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un Termociclador Hybaid y el programa empleado se basó en un ciclo de desnaturalización de 93°C 90 s y 35 ciclos de amplificación (93°C 90 s, 56°C 90 s, 75°C 90 s), según Jayarao *et al.* (1992). Los productos de amplificación correspondientes a cada muestra fueron visualizados en geles de agarosa 1,5% en buffer TAE 1x teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml). Se sembraron 10 µl de cada producto de PCR mezclados con 1 µl de buffer muestra 10x. Cinco microlitros de un marcador de 1 kb con 1 µl de buffer muestra 10x fue usado para determinar el peso molecular de los productos obtenidos. La corrida fue llevada a cabo durante 1 h a 70 V (Jayarao y Oliver, 1994; Gillespie *et al* 1997).

#### 1.9.2.3. Corte con enzimas de restricción y electroforesis

La digestión enzimática del ADN amplificado se realizó con el empleo de buffer B ó C, albúmina sérica bovina 10x, enzimas de restricción HhaI, RsaI y MspI, ADN amplificado y agua tridestilada estéril. La digestión se realizó por incubación a 37°C durante 2 h (Jayarao *et al.*, 1992).

Los productos de ADNr 16S digeridos con cada una de las enzimas de restricción fueron corridos en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml), y en buffer TBE 0,5X a 65 V durante 2 h. Se sembró 1µl de buffer muestra 10x por cada 10 µl del producto de digestión. El marcador de peso molecular de 100 pb fue sembrado con buffer muestra 10x, a razón de 1 µl de buffer por cada

5 µl de marcador. Los patrones de bandas de ADN fueron visualizados por transiluminación con luz UV. Se usó un digitalizador de imágenes (Alpha Innotech Corporation) y los registros fueron guardados en formato tiff (Tagged image file format) (Jayarao *et al.*, 1992).

Los fragmentos de restricción de las cepas de referencia *S. agalactiae* ATCC 3530, *S. dysgalactiae* ATCC 27957, *S. uberis* ATCC 19436, *S. bovis* ATCC 9809 y ATCC 27968, y *E. faecalis* ATCC 19433 fueron analizados según el esquema propuesto por Jayarao *et al.* (1992) (Figura 3).

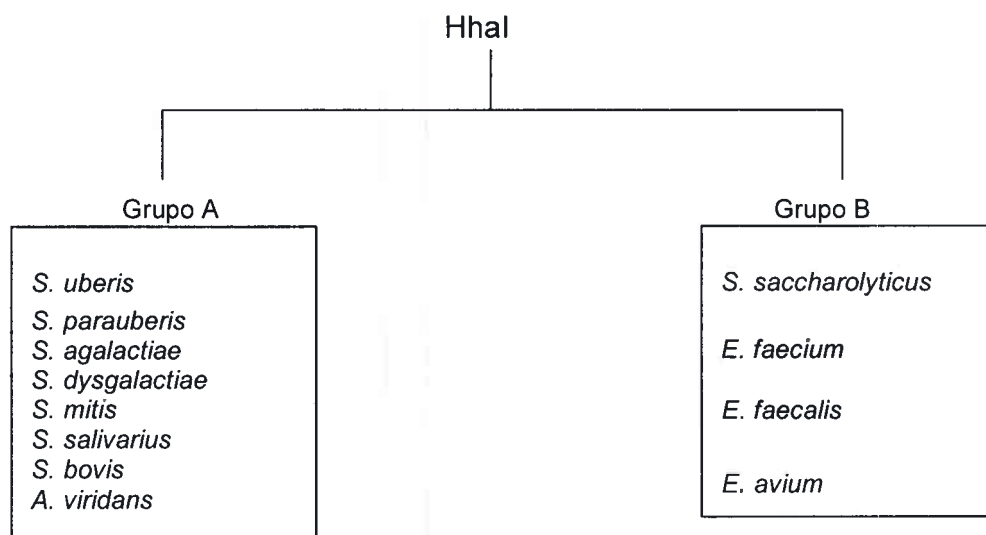


Figura 3. Identificación de especies de *Streptococcus* de origen bovino a partir de la digestión de los productos de amplificación correspondientes al ADNr 16S con las enzimas de restricción HhaI, RsaI y MspI

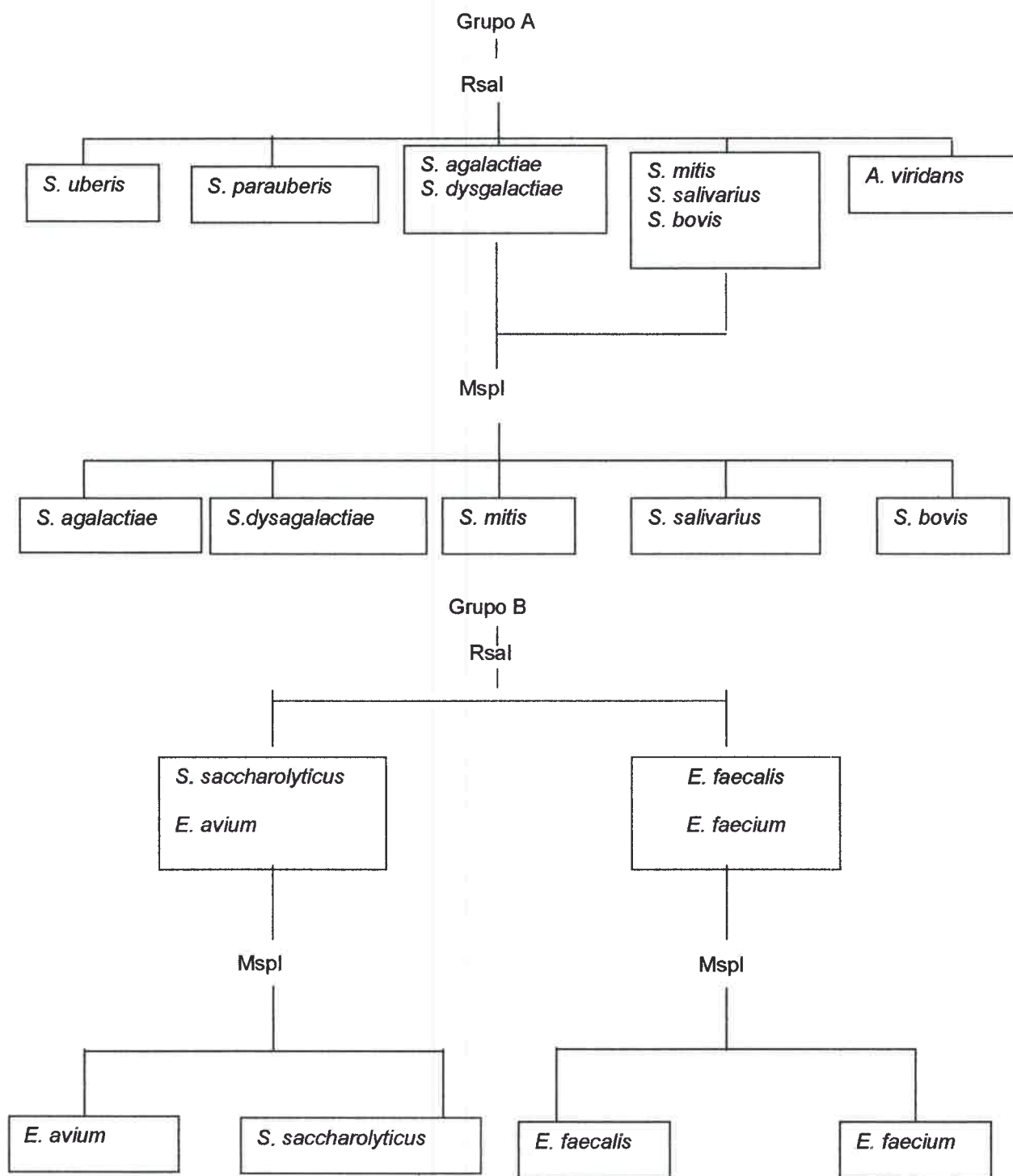


Figura 3. Continuación

## 2. Estudio de la expresión *in vitro* de factores de virulencia

### 2.1. Determinación de cápsula

La cápsula fue determinada mediante la coloración de Anthony según Finegold y Baron (1989). Una ansada de la cepa cultivada en agar sangre durante 24 horas fue homogeneizada con una gota de leche descremada y extendida para lograr una delgada película. Luego de secar al aire se tiñó con una solución acuosa de cristal violeta 1% durante 2 min. Se lavó con sulfato de cobre 20%, se secó y se observó mediante microscopio óptico (100X) (Finegold y Baron, 1989).

Las cepas *S. uberis* UT101 y *S. uberis* UT102 fueron utilizadas como control positivo y negativo de cápsula, respectivamente.

### 2.2. Determinación de Factor Activador del Plasminógeno

Un cultivo en caldo TH incubado a 37°C durante 18 h fue centrifugado 10.000 g durante 20 min a 4°C. Un volumen de 30 µl del sobrenadante fue incubado 1 h a 37°C con plasminógeno bovino 20nM en PBS - lisina 20 nM a pH neutro, libre de plasmina, en relación 1:1. El control negativo consistió en partes iguales de sobrenadante de cultivo y PBS.

Un volumen de 40 µl de la mezcla fue depositado en pocillos practicados en placas de agarosa 1% adicionada con 2% de leche (Leigh, 1994a). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h.

La producción de factor activador del plasminógeno se detectó por conversión del plasminógeno a plasmina y posterior actividad caseinolítica en las placas de agarosa-leche.

### 2.3. Determinación del factor uberis

Se sembró una estría de la cepa *Staphylococcus aureus* RC8 productora de β-hemolisina en agar sangre (Odierno *et al.*, 1994). En sentido perpendicular, se sembraron estrías de diferentes cepas de *S. uberis*.

La formación de una zona de hemólisis total en la proximidad de las estrías luego de 24 h de incubación a 37°C indicó producción de factor uberis (Lopes *et al.*, 1995).

Se empleó la cepa *S. agalactiae* ATCC 3540 y *S. dysgalactiae* ATCC 27957 como control positivo y negativo, respectivamente.

#### 2.4. Determinación de hialuronidasa

Un cultivo en caldo TH incubado a 37°C durante 18 h fue centrifugado 10.000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue esterilizado por filtración a través de membrana Millipore (0,22  $\mu$ m).

Un volumen de 40  $\mu$ l fue depositado en pocillos practicados en placas con medio preparado según Hynes *et al* (1994) y Azeredo *et al* (2001). Brevemente, el medio consistió en ácido hialurónico (400  $\mu$ g/ml), albúmina sérica bovina fracción V 1% y agarosa 2% en buffer NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>/ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H 50nM pH 7,2. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 h, y posteriormente se cubrió la superficie del medio con ácido acético 2 N durante 10 min

La producción de hialuronidasa fue detectada por la formación de un halo claro, resultante de la degradación del sustrato, sobre un fondo opaco blanquecino debido a la precipitación del complejo ácido hialurónico – albúmina con ácido acético. Se usó hialuronidasa testicular bovina (122 U/ml) como control positivo.

Se realizaron al menos dos ensayos de cada cepa por duplicado.

#### 2.5. Determinación de proteasa

Los ensayos se realizaron según la técnica descrita por Ashbaugh *et al.* (1998). Cada cepa fue sembrada en forma de pequeños círculos concéntricos en placas con medio TH suplementado con agarosa 0,8% y leche descremada 3% P/V. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h.

La producción de proteasa con actividad caseinasa se puso en evidencia a través de la formación de una zona de aclaramiento, próximo al sitio de

inoculación. Como control positivo se usó 50  $\mu$ l de papaína (1 mg/ml) dando un halo claro de 6 mm de diámetro. Se realizaron al menos dos ensayos de cada cepa por duplicado.

## 2.6. Determinación de hemolisinas

La producción de hemolisinas fue determinada por la siembra de cada cepa en estrías por agotamiento en placa de agar tripticasa soya (ATS) suplementada con 5% de sangre ovina desfibrinada. Al cabo de 24 h a 37°C se observó la formación de zonas de hemólisis alrededor de las colonias aisladas.

La detección de una zona de decoloración verdusca alrededor de la colonia, debido a un producto biliverdina derivado de la hemoglobina reducida, indicó la producción de  $\alpha$ -hemolisina. La ausencia de hemólisis fue registrada como hemólisis  $\delta$  (Carter y Cole, 1990)

Como controles se utilizaron las cepas *S. dysgalactiae* ATCC 27957, no hemolítica y *Enterococcus faecalis* ATCC 19433  $\alpha$ -hemolítica (Watts J., 1988).

## 3. Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)

### 3.1. Extracción de ADN cromosomal

Se siguió la técnica empleada por Benson y Ferrieri (2001). Un volumen de 0,1 ml de una suspensión bacteriana en Caldo TH con turbidez equivalente a la escala 2 de Mc Farland fue sembrado en la superficie de una placa de agar crecimiento estreptococo (ACE).

Luego de incubar a 37°C durante 24 h, el crecimiento bacteriano fue recogido y homogeneizado en 500  $\mu$ l de buffer TE<sup>1</sup>. (Apéndice)

Se agregaron 20  $\mu$ l de lisozima (50 mg/ml) a 225  $\mu$ l de la suspensión y, luego de incubar 30 min a 37°C, se adicionó 5  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml) y 250  $\mu$ l de agarosa (Low Melting Point) 1,5% temperada a 50°C. Los bloques de agarosa fueron preparados al distribuir en moldes y mantenidos a 4°C por 20 min.

Posteriormente, los bloques fueron incubados con 1,5 ml de Buffer ES y 75  $\mu$ l de proteinasa K, durante 90 min en baño a 55°C. Los bloques fueron lavados con agua libre de iones estéril a 50°C durante 15 min y luego con buffer TE<sup>2</sup> (Apéndice) en idénticas condiciones.

### 3.2. Digestión del ADN genómico y electroforesis

El bloque fue digerido con 5  $\mu$ l de *Sma*I (10 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l de albúmina (10 mg/ml), 20  $\mu$ l de Buffer J y 73  $\mu$ l de agua libre de nucleasas a 25°C durante 3 h. Se preparó un gel de agarosa EEO 1% en TBE 0,5X y se dejó solidificar a 4°C durante 20 min. Parte del bloque de agarosa fue ubicado en una calle, llenando la celda con agarosa LMP 1% y manteniendo a 4°C por 20 min.

La corrida se realizó en buffer TBE 0,5X durante 17 h a 6V/cm, con pulsos que se incrementaron linealmente de 5 a 20 seg, con un ángulo de 120°. Se estableció una temperatura del buffer de corrida de 14°C y una velocidad de flujo de aproximadamente 1 lt/min. Se empleó un equipo CHEF RDIII system (BIO-RAD).

Los geles fueron teñidos con 150 ml de buffer TBE 0,5 X adicionados con 6  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 45 min. Los perfiles de las bandas fueron visualizados en un digitalizador de imágenes (Alpha Innotech Corporation) y los registros fueron guardados en formato TIFF (tagget image file format).

Como marcador de peso molecular se utilizó una cepa de campo, *S. uberis* 155/2. A la misma se le determinó el PM de los fragmentos de restricción usando una cepa de *Staphylococcus aureus* ISP 479C, como marcador de PM, analizada previamente por integrantes del grupo de investigación por PFGE (Giraud *et al.*, 1999). Para ello, ambas cepas fueron analizadas por PFGE y se confeccionó una curva patrón con la cepa de *S. aureus* ISP 479C (Log<sub>10</sub> del peso molecular versus distancia). Paso seguido se determinó la distancia de migración (cm) de cada fragmento de *S. uberis* 155/2 en el gel, y luego se fijó el valor por interpolación con el eje "y"



### 3.3. Interpretación de los patrones de restricción del DNA genómico

El análisis de los perfiles de restricción de ADN digerido con *Sma*I, se llevó a cabo por inspección visual. Para determinar el grado de relación genética entre cepas aisladas de un mismo tambo ó de diferentes tambos, se siguieron los criterios interpretativos según Tenover *et al* (1995). Los autores establecieron que:

- a) Las cepas con idéntico patrón de bandas son consideradas idénticas.
- b) Las cepas que difieren en 1 a 3 bandas, son consideradas cepas relacionadas y reconocidas como subtipos de la misma cepa.
- c) Si las cepas difieren en 4 a 6 bandas, ellas están posiblemente relacionadas.
- d) Si presentan 7 o más bandas diferentes, ellas no están relacionadas.

Para determinar alguna posible asociación entre los perfiles genéticos y los perfiles de virulencia, se analizó:

- El perfil de PFGE de aquellas cepas con idéntico perfil de virulencia.
- El perfil de virulencia de las cepas con perfiles de PFGE idénticos.

### 3.4. Análisis de los perfiles genotípicos

El análisis fue realizado en base a la presencia o ausencia de cada banda identificada en los perfiles genéticos obtenidos, y registrado como 1 ó 0, respectivamente, e incorporado a una matriz.

Se estimó el porcentaje de similitud genética entre dos cepas según el software NT-SYS versión 3.0 por medio del coeficiente de Dice (1945). Los coeficientes de agrupamiento fueron calculados según la media aritmética (UPGMA) con ligamiento completo (Sneath y Sorkal, 1973).

A partir de los cálculos fue construido un dendrograma para determinar el grado de similaridad entre las cepas como así también la posible asociación entre los perfiles genéticos y el origen, tambo y/ó perfil de virulencia.

El dendrograma es una ilustración visual de la representación jerárquica de niveles de relación entre pares de cepas.

#### 4. Determinación de la presencia de genes de virulencia

##### 4.1. Extracción del ADN cromosomal

La extracción de ADN se realizó según las condiciones descritas en el punto 1.9.2.1 de la Sección Métodos.

##### 4.2. Amplificación de los genes de virulencia.

Se llevó a cabo la amplificación de los genes codificantes de la cápsula, FAP y factor uberis, debido a que la secuencia de los correspondientes cebadores (Sección Materiales, tabla 1) está disponible en el GeneBank (tabla 2).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl conteniendo 20 ng de ADN molde, 20 µl de buffer Taq 10X, 1 µM de cada cebador, 0.4 µM de cada dNTP, 3mM de Mg<sub>2</sub>Cl, 1 U de DNA Taq polimerasa y agua destilada estéril.

Tabla 2. Genes de virulencia y sus correspondientes números de acceso del GeneBank

GEN	NUMERO DE ACCESO
<i>pauA / pauB</i> <sup>a</sup>	AJ314852 /AJ0112548
<i>°cfu</i> <sup>b</sup>	U34322
<i>hasA</i> <sup>a,c</sup>	AJ242946
<i>hasB</i> <sup>a,c</sup>	AJ242946
<i>hasC</i> <sup>a,c</sup>	AJ400707

<sup>a</sup>Ward y Leigh(2002); <sup>b</sup>Jiang *et al.*(1996); <sup>c</sup>Field *et al* ( 2003)

Se realizó un control negativo con todos los componentes de la mezcla de reacción, reemplazando el volumen correspondiente al ADN por agua. La amplificación fue realizada en un termociclador Hybaid, mediante el empleo de los programas especificados en la tabla 3.

### 4. 3. Programas de PCR

Tabla 3. Programas de PCR para la amplificación de los genes *pauA/ pauB*, *cfu* y *hasAB/C*

Gen <i>pauA/ pauB</i>	(94°C 60 seg, 54°C 60 seg y 72°C 90 seg) x 30 ciclos y extensión final de 72°C 5 min
Gen <i>cfu</i>	94°C 3 min (92°C 1 min, 45°C 1.30 min, 72°C 1.5 min) x 30 ciclos y extensión final 72°C 5 min
Gen <i>hasAB/C</i>	94°C, 3 min ( 93°C 1 min; 50°C 1.30 min; 72°C 1 min) x 30 ciclos y extensión final de 72°C 8 min

### 4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación fueron revelados en geles de agarosa al 1,5% en buffer TAE y teñidos con 2,5 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), a 75 V durante 1 h. En cada caso se adicionó un volumen de 13 ul del ADN amplificado sin diluir, 4 µl de buffer muestra 10X y se llevó a un volumen final de 20 µl con buffer TE<sup>2</sup>.(Apéndice). Un volumen de 12 µl de la solución de cada producto de PCR y del marcador de peso molecular de 100 bp fue sembrado en cada calle del gel.

Los productos de amplificación fueron visualizados por transiluminación con luz UV. Se usó un digitalizador (Alpha Innotech Corporation) y los registros fueron guardados en formato TIFF (Tagged Image Files Format) para su posterior análisis.

## **5. Ensayo de adherencia e invasión a células epiteliales mamarias**

### **5.1. Cultivo bacteriano**

Diez colonias fueron sembradas en 5 ml de caldo TH durante 16 h con agitación. Se realizó una dilución 1/200 del precultivo en 80 ml de medio y se incubó por 6h. El recuento bacteriano del inóculo inicial se logró por siembra de diluciones seriadas en ACE. El cultivo se centrifugó y el pellet de 10 ml se conservó en glicerol 20% a -20°C. El día del ensayo el cultivo se lavó dos veces, se resuspendió en 10 ml de PBS y se realizó el recuento de células viables en placa.

### **5.2. Células epiteliales mamarias bovinas**

Se usó una línea celular de epitelio mamario bovino (MAC-T). Las células congeladas en nitrógeno líquido fueron resuspendidas en un Medio de Crecimiento Celular (MCC): Medio Dulbecco modificado por Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 5 µg/ml de insulina bovina, y 1 µg/ml de hidrocortisona a pH 7. Se sembraron 0,5 ml de la suspensión en pocillos de una placa de cultivo de tejidos, y se incubó a 37°C con 6% CO<sub>2</sub>. Al cabo de 48 h se descartó el MCC, se lavó la monocapa con PBS y se agregó tripsina al 0,25%. El número de células se estimó por recuento en cámara de Neubauer con azul tripán. Se diluyeron las células con medio MCC suplementado con glutamina y gentamicina (100 µg/ml) y se distribuyó 0,5 ml en cada pocillo para lograr  $2,5 \times 10^5$  cél/ml aproximadamente a las 24 h.

### **5.3. Ensayo de internalización a células epiteliales mamarias**

Se siguió la metodología descrita por Almeida *et al.*(1999a). Las células del epitelio mamario se cultivaron hasta confluencia en policubetas de 24 pocillos. Después de remover el MCC, la monocapa se lavó 4 veces con PBS atemperado a 37°C y posteriormente se agregó el MCC con el inóculo bacteriano en una

concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  cél/ml. Se sembraron 3 pocillos por cada cepa y un control sin inóculo bacteriano. Las placas se homogeneizaron durante 20 min y el cocultivo se incubó a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 1 h de incubación la monocapa fue lavada 4 veces con PBS para remover bacterias no adheridas. Se agregó MCC con lisozima (10 mg/ml), gentamicina (100 µg/ml) y penicilina (1280 µg/ml), y se incubó 2 h a 37°C. La efectividad del tratamiento para destruir las bacterias adheridas extracelulares fue determinado por cultivo en AS.

Después de remover el medio, la monocapa fue lavada con PBS y se agregó tripsina al 0,25% y se llevó a estufa a 37°C, 5 min para lograr que se despeguen las células. Se trató con Tritón X100 al 0,1% durante 10 min a temperatura ambiente. El recuento de las bacterias internalizadas fue determinado por siembra por duplicado de diluciones decimales de los lisados y posterior incubación en ACE 18 h a 37°C por duplicado. Las experiencias fueron realizadas por triplicado.

Se efectuó el recuento de células MAC-T viables del pocillo control sin infectar por la técnica de exclusión del azul tripán. Se determinó la multiplicidad de infección (MI) dividiendo el valor de UFC/ml del inóculo bacteriano inicial por el número de células epiteliales/ml.

Estos estudios fueron realizados en el transcurso de una pasantía realizada en el Laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina en la Universidad Nacional de Buenos Aires, bajo la dirección de la Dra. Fernanda Buzzola.

## **6. Patogénesis temprana y respuesta inflamatoria inducida por *Streptococcus uberis* en cabras**

### **6.1. Recuento Celular Somático en cabras libres de infección intramamaria**

A los efectos de establecer un umbral de células somáticas, se determinó el valor medio del RCS en un rodeo caprino libre de mastitis clínica. A tal fin se

seleccionaron 70 cabras lecheras sin signos visibles de infección intramamaria de un tambo situado a 15 Km de la ciudad de Río Cuarto.

Se recolectaron muestras de leche de cada glándula, se determinó el RCS y se realizó un análisis descriptivo de la distribución del valor del RCS para glándulas infectadas y no infectadas mediante el Soft SPSS, versión 10.10.

Por otra parte se realizó cultivo bacteriológico a cada muestra. Se consideró "Infección" a la presencia de 1 a 3 tipos coloniales diferentes con al menos 5 colonias de cada tipo, en una muestra de 10 µl de leche según los criterios establecidos por Moroni *et al.* (2005).

## 6.2. Animales

Para realizar el estudio en cabras sin historia previa de *S. uberis*, se determinó el RCS y la presencia de *S. uberis* a los 14 y 7 días previos al ensayo en muestras de leche de cada cuarto de 18 cabras provenientes de un tambo situado en las proximidades de la ciudad de Río Cuarto. De las cabras bacteriológicamente negativas y con menos de  $10^6$  células somáticas/ml, se seleccionaron 6 cabras de la raza Sannen de primera parición y en lactancia media, teniendo en cuenta que el número de pariciones y mes de lactación, son factores de variación del RCS de origen no infeccioso en leche de cabra. (Sanchez *et al.*, 1999).

Las cabras fueron alimentadas con una ración diaria de 1 kg de maíz molido/cabra y tuvieron libre acceso a fardos y al agua.

## 6.3. Preparación del inóculo

La cepa usada en la infección experimental fue *S. uberis* IR47, aislada de mastitis clínica productora de cápsula, factor activador de plasminógeno, proteasa,  $\alpha$  hemolisina y con capacidad de invasión a células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T).

Para determinar la dosis bacteriana, se realizaron 2 ensayos previos mediante la inoculación de  $8 \times 10^2$  y  $2,4 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente. La dosis elegida fue

de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml, dado que mostró cambios en los parámetros analizados dentro de un período de 24 h.

A partir de diez colonias de la cepa IR47 crecidas en AS, se realizó un precultivo en 5 ml de caldo TH durante 16 h en agitación. Posteriormente, se efectuó una dilución 1/200 y se incubó durante 3 h, hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. El recuento de células viables del inóculo se determinó por siembra de diluciones seriadas en AS. La suspensión bacteriana se conservó a 4°C hasta el momento de la inoculación en el corral.

#### 6.4. Diseño del experimento

Seis cabras fueron inoculadas luego del ordeño de la mañana, previo lavado y desinfección con alcohol de los pezones. Un volumen de 1 ml de la cepa *S. uberis* IR47 con  $1,7 \times 10^8$  UFC/ml fue inoculado por vía intramamaria en la cisterna de la glándula derecha, con una aguja de extremo romo. Posteriormente se efectuaron masajes para favorecer el movimiento ascendente del inóculo. La glándula izquierda inoculada simultáneamente con 1 ml de solución fisiológica estéril fue considerada control negativo.

Las cabras fueron ordeñadas manualmente una vez durante el ensayo. Durante la experiencia las cabras fueron examinadas clínicamente cada 4 h y en cada muestreo se recolectaron muestras de leche y sangre.

Para efectuar la recolección de leche, los pezones fueron lavados y desinfectados con alcohol. Luego de eliminar el primer chorro de leche, se recogió un volumen de 40 ml de cada glándula en envases separados, y se conservó con azidiol a 4°C hasta su procesamiento, dentro de las 24 h de recolección.

Además, de cada animal, se extrajo un volumen de 2 ml de sangre de la vena yugular con la sal sódica del ácido diaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante.

A partir de las 8 h post inoculación se practicó eutanasia a una cabra cada 4 hs para efectuar estudios bacteriológicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos.

La cabra restante fue sometida a tratamiento con antibiótico para su recuperación y cura bacteriológica.

En la necropsia se recolectaron muestras de tejidos de pulmón, hígado, bazo, ganglio linfático mamario derecho e inguinal profundo derecho, canal del pezón, cisterna de la glándula, y secciones de la zona distal, central y proximal de glándula mamaria derecha e izquierda.

## 6.5. Análisis de leche

### 6.5.1. Recuento de células somáticas

Una característica que define a la glándula mamaria caprina y la diferencia de la secreción en el ganado bovino, es su predominante carácter apócrino. Así, durante el mecanismo normal de secreción, las células epiteliales pierden parte de su citoplasma aportando una gran cantidad de partículas citoplasmáticas a la leche, de tamaño similar a los leucocitos pero, que carecen de ácido nucleico. Este tipo de secreción láctea condiciona el uso de una determinada técnica, que cuenta solamente las células presentes, a través de la unión de un fluorocromo al ADN permitiendo diferenciar adecuadamente entre partículas citoplasmáticas y células epiteliales (Contreras *et al.*, 1997).

Por lo tanto para el realizar el RCS se empleó el método de Fluorocitometría Laser recomendado por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF 148A:1995). Las muestras conservadas con azidol fueron procesadas en un lapso no mayor a 24 h en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Villa María con un equipo Somacount 300 (Bentley). Inicialmente la muestra de leche fue colocada en un baño María a 40°C, luego homogeneizada con un agitador incorporado al equipo para la posterior determinación de RCS. Los resultados fueron registrados como cél/ml x1000.

### 6.5.2. Recuento bacteriano total



El recuento bacteriano total se llevó a cabo por el método de Citometría Laser, con un equipo Bentley IBC, en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Villa María.

Las muestras de leche fueron incubadas a 50°C y adicionadas con un reactivo constituido por un buffer de clarificación para lisar las células somáticas, una enzima proteolítica para solubilizar los glóbulos de grasa y las proteínas y un marcador fluorescente para permeabilizar las bacterias y teñir su ADN. Esta mezcla fue sonicada para contribuir a descomponer las partículas que interfieren y a disgregar bacterias aglomeradas, para mejorar la detección individual. Luego de un período de incubación, las muestras fueron transferidas automáticamente a la celda de lectura y expuestas a un rayo láser. La señal fluorescente se transforma en conteo de bacterias individuales mediante la calibración del instrumento.

#### 6.5.3. Recuento de *S. uberis*

El recuento de *S. uberis* se realizó mediante el método de dilución en placa a partir de muestras de leche colectadas con una frecuencia de 4 h de cada glándula de cada cabra. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento, teniendo en cuenta el mantenimiento de título de la cepa durante un período de 30 días a -20°C.

Para asegurar la identidad entre la cepa *S. uberis* IR47 inoculada y la cepa recuperada de leche y de órganos durante el ensayo, se determinó la expresión *in vitro* del factor activador de plasminógeno, cápsula, proteasa y  $\alpha$ -hemolisina, como así también la presencia de los genes *pauA*, *pauB*, *hasAB*, *hasC* y *cfu*.

#### 6.6. Análisis de sangre

Se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular de cada cabra en cada tiempo del ensayo. Los análisis bioquímicos fueron llevados a cabo por el Dr.

Oscar Forchetti en el laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC).

#### 6.6.1. Recuento leucocitario total

La determinación del recuento leucocitario total se realizó según Jubb *et al.*, (1990). La concentración de leucocitos en sangre fue estimada mediante el método directo en la cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Jubb *et al.*, 1990).

#### 6.6.2. Formula relativa leucocitaria

La determinación de la fórmula relativa leucocitaria se realizó según Jubb *et al.*, (1990). Se llevó a cabo la confección del frotis y posteriormente la monocapa de células hemáticas fue coloreada con la tinción con May Grunwald – Giemsa. Para ello se aplicó el colorante May Grunwald durante 3 min, se lavó y se agregó colorante de Giemsa diluido, 15 min. Finalmente se lavó y se observó al microscopio la morfología y proporción relativa de células leucocitarias.

#### 6.7. Examen clínico

Durante la experiencia las 6 cabras fueron examinadas clínicamente por inspección visual, palpación de la ubre y medición de la temperatura rectal cada 4 horas. La progresión de las manifestaciones clínicas se registraron con la siguiente escala: 0: No reacción, 1: Débil, 2: Moderado y 3: Fuerte.

#### 6.8. Muestras de tejidos para examen bacteriológico

Las muestras constituidas por 5 g de tejido de glándula mamaria derecha e izquierda, hígado, bazo y pulmón obtenidas luego de la eutanasia y conservadas a -20°C, fueron posteriormente pesadas y homogeneizadas en 3 ml de PBS con la ayuda de un mortero. Para determinar el número de células viables de la suspensión se realizó la siembra por duplicado de un volumen de 0.1 ml de las

diluciones decimales en AS. Por último, se determinó el recuento de células viables por gramo de tejido.

#### 6.9. Muestras de tejido para histopatología e inmunohistoquímica

Se estudiaron muestras de pulmón, hígado, bazo, ganglio linfático mamario derecho e inguinal profundo derecho, canal del pezón, cisterna de la glándula, y secciones de la zona distal, central y proximal de glándula mamaria derecha e izquierda. Cada muestra (1 cm<sup>3</sup>) fue fijada con formaldehído al 10%. Previo a la inclusión en parafina, fue necesario deshidratar con alcohol en gradación creciente (50% a 100%). Se colocaron luego las muestras en moldes de parafina.

#### 6.10. Histopatología

Una vez solidificado los bloques, se efectuaron cortes de 10 µm de grosor, los que se extendieron sobre un portaobjetos. Se desparafinaron con xilol 100% y se rehidrataron con alcohol en gradación decreciente (100% a 70%). Se usó la coloración Eosina-Hematoxilina, para ello se cubrió el tejido fijado al portaobjetos con hematoxilina por 5 min. Se eliminó el exceso de colorante con alcohol ácido (CIH-alcohol 70%). Se lavó con agua y se sumergió en carbonato de litio 30 s. Se lavó con agua y se coloreó 1 min con eosina. Por último se lavó con agua.

Después de la coloración se deshidrató nuevamente con alcohol de gradación creciente, paso seguido se eliminó alcohol con xilol 100%. Se observó al microscopio óptico usando bálsamo de Canadá como medio de montaje.

Los preparados se observaron con microscopio óptico con 10X, y se seleccionaron 5 campos al azar. De cada campo, se contabilizaron el número de lobulillos. De cada lobulillo se contaron sólo las unidades secretoras (US) con cambios en su luz (CA: corpórea amilácea; Ca: calcificación; PMN: neutrófilos/piocitos). El número de unidades secretoras afectadas se expresó como el % del total de US con alteraciones específicas observadas. El número de

US refleja la extensión de las lesiones, así a mayor número más compromiso glandular (Bacha y Bacha, 2001).

El procesamiento completo de las muestras y la observación microscópica fue realizado por el Dr. Carlos Perfumo de la Universidad Nacional de La Plata.

#### 6.11. Inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) permiten la identificación y localización de las bacterias en muestras titulares mediante la aplicación directa de anticuerpos policlonales.

El antisuero policlonal obtenido en conejo por inmunización experimental con la cepa *S. uberis* IR 47 muerta con formol, fue usado como anticuerpo primario.

##### 6.11.1. Obtención de anticuerpos específicos contra *S. uberis*

##### 6.11.2. Animales

Se usaron 2 conejos machos de la raza Nueva Zelanda blancos de 12 semanas (2 a 3 Kg), libres de infección. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales en el bioterio (FAyV) con ciclos de 12 hs de iluminación. Se adoptaron las condiciones adecuadas para el cuidado de animales de experimentación (Olfert *et al.*, 1993).

##### 6.11.3. Preparación del antígeno

A partir de diez colonias de la cepa IR47 crecidas en AS, se realizó un precultivo en 5 ml de caldo TH durante 16 h en agitación. Posteriormente, se efectuó una dilución 1/200 en 80 ml de caldo TH suplementado con dextrosa (100mgr/ml) y se incubó 6 hs en agitación a 37°C. Un volumen de 0,1 ml fue sembrado en cada una de 3 placas de TH agar por diseminación en superficie.

Se comprobó la presencia de cápsula mediante la coloración de Anthony y a continuación se recogió el crecimiento bacteriano de las 3 placas y se

resuspendió en 60 ml de PBS. El recuento de células viables del inóculo se determinó por siembra de diluciones seriadas en TH agar. Se esterilizó la suspensión con el agregado de formalina a una concentración final del 3%, y mantenimiento a temperatura ambiente por 24 h. Se centrifugó 20 min a 4000 g y el precipitado se resuspendió en formalina al 0,5% en PBS. Luego de confirmar la esterilidad de la suspensión bacteriana por siembra en AS, se fraccionó en viales de 1,5 ml y se conservó a 4°C.

#### 6.11.4. Esquema de inmunización

Se inmunizaron dos conejos libres de infección, a los cuales se les extrajo sangre a los 7 y 14 días previos a la inoculación a los efectos de controlar la ausencia de anticuerpos anti *Streptococcus uberis*. Estos sueros pre-inmunes fueron usados como control negativo.

El esquema de inmunización consistió en la inoculación por vía intravenosa de volúmenes crecientes desde 0,1 a 0,5 ml del antígeno ( $1 \times 10^{13}$  UFC/ml) sin adyuvante, 2 veces por semana durante 4 semanas. A la 5ª semana se aplicó la dosis de refuerzo que consistió en administrar un volumen de 0,1 ml de antígeno por vía subcutánea. Los animales fueron sangrados a los 7 días de la última dosis para obtener el suero inmune (Fournier *et al.*, 1984).

#### 6.11.5. Obtención de suero inmune

Se realizó la extracción de sangre por punción de la vena marginal de oreja, debidamente rasurada y previa antisepsia con alcohol al 70%. Luego de 1h a temperatura ambiente, la sangre fue centrifugada para separar el suero. El suero fue distribuido en alícuotas y conservado a -20°C.

La presencia de anticuerpos específicos se determinó por la técnica de aglutinación en placa. Quince microlitros de suero se mezclaron con igual volumen de la suspensión antigénica sensibilizante sobre un portaobjetos. Se homogeneizó suavemente durante 30 seg con ayuda de una varilla de vidrio y se colocó el cubreobjetos para su observación al microscopio. Se realizó un control negativo

con el suero preinmune a los efectos de descartar cualquier posible aglutinación inespecífica. El título de anticuerpos específicos se determinó como la inversa de la más alta dilución del suero capaz de inhibir la aglutinación.

#### 6.11.6. Técnica inmunohistoquímica

Las muestras incluidas en parafina se desparafinaron y rehidrataron por inmersiones secuenciales de los cortes en xilol (2 veces durante 10 minutos) y gradaciones decrecientes de alcohol etílico (2 veces a 100° 10 min, y 96° 5 min, y 80° 5 min, 1 vez). Paso seguido se dejó 5 min en inmunobuffer (PBS/Tween).

El bloqueo de peroxidasas endógenas del tejido, fue un paso necesario en este protocolo ya que se usó peroxidasa (horseradish peroxidase, HRP) como marcador. El mismo se logró tras la inmersión en una solución de 3% de peróxido de hidrógeno en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se lavaron en PBS/Tween (1 vez por 5 min).

Fue necesario lograr el desenmascaramiento de epítopes, ya que durante la fijación y en los métodos post-inclusión muchos epítopes antigénicos pueden ser destruidos o enmascarados. Las condiciones hidrofóbicas y de alta temperatura que sufren las muestras al incluirlas en parafina son procedimientos que provocan destrucción de epítopes. Por lo tanto para lograr la recuperación antigénica se llevaron los cortes a calor húmedo en una vaporiera por 40 minutos. Se lavó con PBS/Tween durante 5 min.

Con la finalidad de bloquear sitios de unión inespecíficos, los cortes fueron expuestos a suero normal equino por 40 min a temperatura ambiente. A continuación se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario, suero policlonal anti *S. uberis* dilución 1:200, 12 horas a 4°C en cámara húmeda.

Paso seguido se procedió a la incubación con proteína G-biotina (10µg/ml) dilución 1/500, (proteína recombinante que se une a inmunoglobulina de la mayoría de los mamíferos), durante 45 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Se dejó 5 min en PBS/Tween.

Se usó el complejo estreptavidina/peroxidasa como sistema de detección. Para ello se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavó con PBS/Tween, 5 min y se reveló la reacción mediante el agregado del sustrato cromogénico, 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorato (DAB) durante 10 min. Una reacción positiva es considerada por observación de un precipitado oscuro, por reacción con el agua oxigenada mediado por la peroxidasa. Se lavó con agua corriente. Se realizó una coloración de contraste, sumergiendo los cortes en hematoxilina. Se realizó el montaje y se observó al microscopio.

Los estudios inmunohistoquímicos fueron realizados por el Dr. Carlos Perfumo de la Universidad Nacional de La Plata.

## *Resultados y Discusión*



## VII. Resultados

### 1. Identificación a nivel de especie de cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis clínica y subclínica

#### 1.1 Bacteriología convencional

La identificación preliminar basada en morfología colonial, tinción de Gram y prueba de la catalasa permitió el aislamiento de 205 cepas de cocos Gram positivos catalasa negativos, a partir de las muestras de leche bovina obtenidas de vacas con mastitis clínica y subclínica, provenientes de 18 establecimientos, ubicados en las Provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires.

Para contribuir a la selección de presuntos estreptococos se utilizó la prueba de crecimiento en caldo cloruro de sodio. La elección se realizó en base a la capacidad de crecer en este medio presentada por los miembros del género *Enterococcus* y la ausencia de crecimiento mostrado por el género *Streptococcus*. (McDonald y McDonald, 1976a; Watts J., 1988). Los resultados obtenidos mostraron que ciento setenta y ocho (87%) de las 205 cepas resultaron negativas en la prueba de crecimiento en cloruro de sodio 6,5%.

Se realizó la identificación de las 178 cepas, según el esquema taxonómico diseñado por Odierno *et al.*, 2006. Para ello, 6 cepas de referencia *S. agalactiae* ATCC 3530, *S. dysgalactiae* ATCC 27957, *S. uberis* ATCC 19436, *S. bovis* ATCC 9809 y ATCC 27960, y *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, fueron analizadas e identificadas a nivel de especie en un ensayo a ciegas. Las pruebas fisiológicas empleadas fueron ensayadas mediante el empleo de controles positivo y negativo. Los resultados fueron obtenidos de al menos 3 ensayos.

Un total de 54 cepas, 17 aisladas de casos clínicos y 37 de mastitis subclínica, fueron identificadas como pertenecientes a la especie *S. uberis*.

Se identificaron 11 perfiles bioquímicos (11-21) en las 17 cepas de origen clínico y 20 perfiles (1-20) del estudio de las 37 cepas de origen subclínico perfiles. (Tabla 4).

Tabla 4. Perfiles bioquímicos de las cepas de *S. uberis* aisladas de infecciones intramamarias

Perfil	NaCl	Camp	Hipurato	Esculina	Arginina	Crec 45 C°	Inulina	Manitol	Sorbitol	Rafinosa	Salicina
1*	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
2*	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
3*	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
4*	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
5*	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1
6*	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
7*	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0
8*	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
9*	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
10*	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1
11●	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
12●	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0
13●	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
14●	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
15●	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
16●	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
17●	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1
18●	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
19●	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
20●	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
21■	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1

Origen de las cepas: (\*): subclínicas, (●): clínicas y subclínicas, (■): clínicas.  
Resultados: positivo, 1; negativo, 0.

Se puede observar que cepas clínicas y subclínicas comparten determinados perfiles. De esta manera, la identificación de 21 perfiles bioquímicos en las 54 cepas en estudio indica la marcada variabilidad fisiológica presentada por esta especie.

Los resultados obtenidos coinciden con los descriptos por Odierno *et al.* (2006). Los autores mostraron un elevado número de perfiles bioquímicos atípicos en 33 de las 47 cepas *S. uberis* analizadas que difieren de la cepa de referencia *S. uberis* ATCC 27958.

## **1.2. Confirmación de las cepas de *S. uberis* por la técnica de los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Se realizó la identificación a nivel de especie por la técnica de análisis de RFLP obtenidos mediante las enzimas de restricción *HhaI*, *RsaI* y *MspI* según el esquema molecular propuesto por Jayarao *et al.* (1992) para la identificación de patógenos asociados a mastitis bovina.

Las cepas de referencia *Streptococcus agalactiae* ATCC 3530, *S. dysgalactiae* ATCC 27957, *S. uberis* ATCC 19436, *S. bovis* ATCC 27960 y *E. faecalis* ATCC 19433, analizadas mediante RFLP presentaron un patrón de bandas idéntico al descrito por Jayarao *et al.* (1992).

La especie *S. uberis* fue identificada mediante los fragmentos de restricción de 600, 550 y 290 pb obtenidos con la endonucleasa *HhaI*, y de 610, 240, 210 y 170 pb luego de la digestión con la enzima de restricción *RsaI* del producto de amplificación correspondiente al DNAr 16S. Ambos perfiles se observaron para la cepa de referencia *S. uberis* 19436. (Figura 4, calle 9 y Figura 5, calle 7).

Las cepas de campo caracterizadas mediante pruebas bacteriológicas convencionales como pertenecientes a la especie *S. uberis*, fueron ensayadas por RFLP. Trece de las 17 (76,5%) cepas de *S. uberis* de origen clínico presentaron perfiles de restricción, luego de la digestión con las enzimas *HhaI* y *RsaI*, idénticos

al obtenido con la cepa de referencia *S. uberis* 19436 (Figura 4, calles: 1-3 y Figura 5, calles: 1-3, respectivamente)

De las 37 cepas de *S. uberis* de origen subclínico, treinta (81,1%) cepas mostraron, luego de la digestión de los productos de PCR con las enzimas *HhaI* y *RsaI*, un patrón de bandas idéntico al obtenido para la cepa de referencia (Figura 4, calles: 4-8 y Figura 5, calles: 4-6, respectivamente).

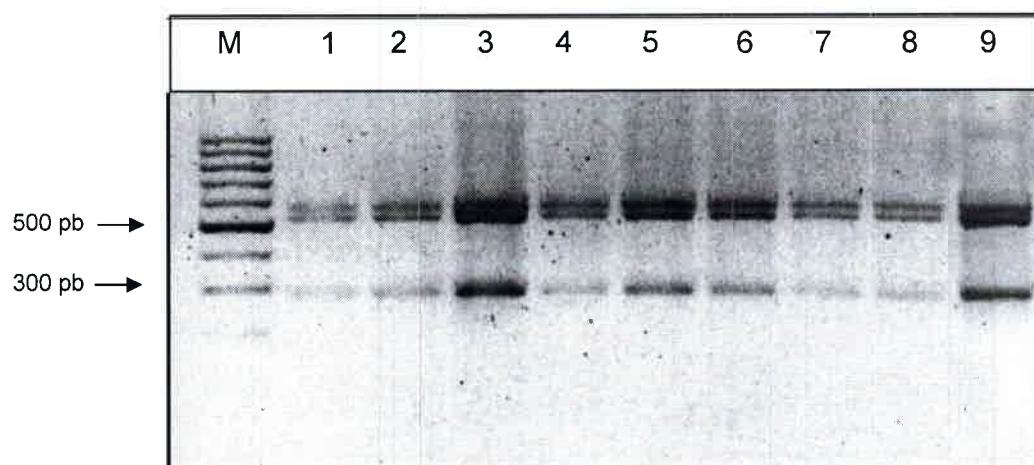


Figura 4 . Productos de amplificación del ADNr 16S de cepas de *S. uberis* digeridos con *HhaI*. Calles 1-3: cepas clínicas, 4-8: cepas: subclínicas,9: *S.uberis* 19436. M: marcador de 100 pb.

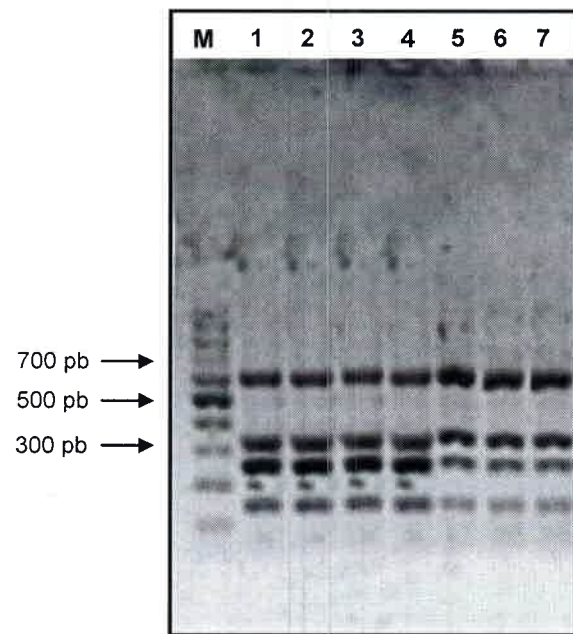


Figura 5. Productos de amplificación del ADNr 16S de cepas de *S. uberis* digerido con *Rsal*. Calles 1-3. cepas clínicas, 4-6: cepas subclínicas, 7: *S.uberis* 19436, M: marcador de 100 pb.

El esquema basado en la técnica de RFLP ADNr 16S permitió confirmar la identificación a nivel de especie de 43 (79,6%) cepas de un total de 54, previamente clasificadas *S. uberis* por la metodología convencional.

Khan *et al* (2003) desarrollando la misma técnica de amplificación de los genes ADNr 16S por la reacción en cadena de la polimerasa, seguida de la digestión con diferentes endonucleasas, *Rsal* y *Avall* lograron confirmar el 100% de las cepas identificadas como *S. uberis* por bacteriología convencional

Estudios similares basados en el análisis del DNAr 16S-23S por PCR-RFLP y una combinación de endonucleasas de restricción *HaeIII*, *AluI* y *HaeIII*, *Rsal* permitieron identificar 47 (82,4%) de un total de 57 cepas de *S. uberis* clasificadas por métodos convencionales (McDonald *et al.*, 2005).

De las 11 (20,4%) cepas erróneamente identificadas por las pruebas convencionales en el presente estudio, siete resultaron ser *E. faecalis* y cuatro *S. bovis* mediante la técnica molecular. El porcentaje de cepas erróneamente

identificadas, fue superior al descripto por otros autores (Watts., 1989, Fortin *et al.*, 2003), quienes informaron que la metodología convencional identifica como *S. uberis* a cepas que pertenecen al género *Enterococcus* spp. por sistema comercial rápido APi 20 STREP ó Rapid Strep.

De esta manera, la técnica RFLP es un método más confiable con relación a la caracterización basada en métodos fenotípicos para la identificación de cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis bovina. En general los métodos focalizados en la composición del ácido nucleico de las bacterias no están sujetos a la variabilidad asociada con las condiciones de cultivo que pueden llevar a características bioquímicas atípicas.

### 1.3. Cepas de *Streptococcus uberis*

Tabla 5. Cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis clínica y subclínica

Cepas Clínicas		
Cepas	Tambo	Provincia
1690	15	Buenos Aires
397	14	Buenos Aires
396	14	Buenos Aires
80(3-8)	10	Buenos Aires
78 (1-7)	9	Buenos Aires
75(3-6)	13	Buenos Aires
13	15	Buenos Aires
IR47	2	Santa Fe
IR46	2	Santa Fe
IR25	4	Santa Fe
IR23	1	Santa Fe
IR24	18	Córdoba
IR16	17	Córdoba

**Cepas Subclínicas**

Cepas	Tambo	Provincia	Cepas	Tambo	Provincia
218 (1-7)	9	Buenos Aires	44 (2-5)	12	Buenos Aires
33(3-6)	13	Buenos Aires	8 (1-1)	8	Buenos Aires
191 (1-7)	9	Buenos Aires	31 (3-1)	7	Buenos Aires
180 (1-4)	11	Buenos Aires	19 (1-1)	8	Buenos Aires
168( 2-5)	12	Buenos Aires	251-2	6	Santa Fe
5 (1-4)	11	Buenos Aires	155-2	6	Santa Fe
89 (2-5)	12	Buenos Aires	776a	3	Santa Fe
80 (2-5)	12	Buenos Aires	57	5	Santa Fe
80 (3-8)	10	Buenos Aires	12	5	Santa Fe
73 (1-7)	9	Buenos Aires	928/4	16	Córdoba
73 (3-6)	13	Buenos Aires	904/2	16	Córdoba
72 (1-1)	8	Buenos Aires	102-3	16	Córdoba
69(1-1)	8	Buenos Aires	69/1	16	Córdoba
51 (2-5)	12	Buenos Aires	33/2	16	Córdoba
45 (1-4)	11	Buenos Aires	23-1	16	Córdoba

**1.4. Ubicación geográfica de los tambos**

Figura 6. Tambos de la Cuenca Lechera Central



Referencias:

- Tambos N° 1-5
- Tambos N° 6
- Tambos N° 7-15
- Tambos N° 16
- Tambos N° 17-18

## 2. Estudio de la expresión *in vitro* de factores de virulencia

Los factores que contribuyen a la patogénesis de *S. uberis* no están completamente dilucidados, aunque varios potenciales determinantes de la virulencia han sido descritos, tales como cápsula, factor activador de plasminógeno, factor uberis, hialuronidasa, entre otros. Por este motivo se abordó el estudio de los siguientes factores de virulencia:

### 2.1. Cápsula.

La presencia de cápsula, determinada por la coloración de Anthony, se caracterizó por la observación de la estructura capsular sin teñir contra un fondo púrpura, mientras que las células se mostraron intensamente teñidas de color púrpura (Figura 7 A).

La ausencia de cápsula se puso en evidencia por la observación de células teñidas de color púrpura y en algunos casos rodeada de un pequeño halo con tonalidad lilácea (Figura 7 B). Se utilizaron las cepas de referencia *S. uberis* UT 101, productora de cápsula, y *S. uberis* UT 102, no productora de cápsula.

Los resultados obtenidos en las cepas de campo se presentan en la Tabla 5 y resultaron de al menos 3 ensayos para cada cepa. Sobre un total de 13 cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis clínica se detectaron, 8 (61,5%) cepas productoras de cápsula. Dieciocho (60%) de los 30 aislamientos de *S. uberis* de origen subclínico mostraron producción de cápsula. La frecuencia de cepas capsuladas, tanto de origen clínico como subclínico, descritas en el presente estudio fueron similares.

El porcentaje de cepas capsuladas hallado en este estudio es superior al descrito por Matthews *et al.* (1994a), quienes informaron una frecuencia de expresión de cápsula del 44% en un estudio realizado en Estados Unidos a partir de 100 cepas de *S. uberis* aisladas de secreciones mamarias bovinas.



Field *et al.*, (2003) pusieron en evidencia que la cápsula no es requerida para el desarrollo de la mastitis clínica. Los autores demostraron que tanto la cepa parental *S. uberis* 0140J capsulada como la mutante TRF-6 que ha perdido la capacidad de producir cápsula de ácido hialurónico, infectan la glándula mamaria luego de la inoculación experimental.

No obstante estos investigadores detectaron la presencia de los genes *has* AB/C responsables de la biosíntesis de cápsula en el 98,7% de los aislamientos de los casos clínicos, estableciendo un rol para esta estructura.

Según Field *et al.* (2003) la cápsula puede ejercer un efecto a nivel de penetración en la glándula mamaria. Además, *S. uberis* sería capaz de producir un ambiente que inhibe el efecto bactericida de los neutrófilos, posibilitando de este modo que cepas acapsuladas puedan persistir y desarrollar mastitis clínica, aunque la naturaleza de esta actividad inhibitoria permanece sin esclarecerse.

## 2.2. Producción del factor activador de plasminógeno

La producción de factor activador del plasminógeno (FAP), determinada por siembra del sobrenadante del cultivo adicionado con plasminógeno en placa de agarosa-leche, fue detectada por observación de un halo de actividad caseinolítica resultante de la conversión de plasminógeno a plasmina por el factor activador del plasminógeno

Como control positivo, se usó la cepa *S. uberis* IR47 que invariablemente ha dado resultado positivo al cabo de 5 repeticiones. Los resultados del análisis de las cepas de campo fueron obtenidos de al menos 3 ensayos (Figura 8).

Once (84,7%) de las trece cepas de *S. uberis* de origen clínico resultaron productoras de FAP, mientras que 19 (63,3%) de las 30 cepas de *S. uberis* de mastitis subclínica mostraron producción de este factor (Tabla 6).

En este estudio, la frecuencia de cepas productoras de FAP en cepas aisladas de casos clínicos fue mayor a la encontrada en cepas de origen subclínico.

El porcentaje de cepas de origen clínico (84,7%) productoras de FAP hallado en cepas de *S. uberis*, aisladas de la cuenca lechera central de nuestro país, fue similar al valor informado por Leigh (1994a). Este autor reportó en una investigación realizada en Inglaterra que aproximadamente un 90% de las cepas de *S. uberis* obtenidos de casos clínicos de mastitis bovina expresaron este factor. Estos hallazgos muestran la importancia del FAP como activador del plasminógeno bovino presente en leche.

La plasmina activa, con actividad serín proteasa, posee importantes funciones en procesos fisiológicos como la degradación de proteínas de la matriz extracelular, activación de proenzimas como las colagenasas y fibrinólisis de coágulos de sangre, facilitando así, la penetración de los tejidos y contribuyendo a la colonización (Lincoln y Leigh, 1998).

Dado que *S. uberis* posee requerimientos nutricionales fastidiosos, la activación del plasminógeno endógeno, también facilitaría la hidrólisis de las proteínas de la leche y liberación de aminoácidos favoreciendo su proliferación en la glándula mamaria. (Gilbert *et al.*, 1997).

Además, la unión de la plasmina bovina a la superficie celular de *S. uberis* por cultivo en presencia de plasminógeno podría facilitar no sólo la proliferación e invasión bacteriana por hidrólisis de proteínas del huésped, sino también evitar la opsonización por clivaje de las inmunoglobulinas y/o inducir inflamación por activación de la cascada del complemento (Lincoln y Leigh, 1988)

### 2.3. Factor uberis

La producción de factor uberis se determinó por la formación de una zona de hemólisis total resultante de la acción sinérgica entre el factor proteico extracelular liberado por *S uberis* y la beta hemolisina de *S aureus* (Figura 9)

La determinación del factor uberis mostró que 3 (23,1%) cepas de casos clínicos y 7 (23,3%) cepas de casos subclínicos resultaron productoras de este potencial factor de virulencia (Tabla 6).

Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por varios autores (Mc Donald *et al.*, 1976, Skalka y Smola., Donald y Mc Donald (1976a), informaron una frecuencia de *S uberis* CAMP positivas del 32 % y 25,3 %, a partir de 15 cepas procedentes de un rodeo y de 182 cepas aisladas de 71 rodeos, respectivamente.

En el estudio realizado por Skalka y Smola (1981), los autores reportaron que 58 (35 %) de 81 cepas de *S. uberis* investigadas poseían actividad hemolítica sinérgica. Por último, Christ *et al* (1988) y Lammler *et al* (1991) y reportaron 28% y 10% cepas CAMP positivas , respectivamente.

### 2.4. Hialuronidasa

En este estudio se realizó la determinación de la producción de hialuronidasa según Hynes (1994), utilizando hialuronidasa testicular bovina (122 U/ml;) como control positivo, mediante la observación de un halo claro por degradación del ácido hialurónico sobre un fondo opaco blanquecino (Figura 10).

Diecinueve (63,3%) de las 30 cepas de *S. uberis* de origen subclínico resultaron productoras de hialuronidasa, mientras que 8 (61,5%) de los 13 aislamientos provenientes de mastitis clínica resultaron positivos para este factor (Tabla 6).

De las investigaciones dirigidas al estudio de la hialuronidasa en el género *Streptococcus*, sólo una de ellas ha sido abordada en la especie *S. uberis*. por

Khan *et al.* (2003). Los autores informaron sobre el aislamiento de un 35% de cepas hialuronidasa positivas de un total de 135 cepas de *S. uberis* aisladas en Alemania, empleando un técnica diferente a la del presente trabajo.

El elevado porcentaje de cepas productoras de hialuronidasa hallado en el presente estudio, podría ser atribuido a la regulación de la producción de la enzima en respuesta a condiciones que simulan a las que se encuentran *in vivo*. Cabe mencionar, que niveles incrementados de hialuronidasa como consecuencia de la adición de hialuronato al medio ha sido demostrado en los estreptococos del grupo A (Hynes 2000).

Las investigaciones realizadas por Hynes *et al.* (1995) en estreptococos del grupo A han identificado la producción de hialuronidasa extracelular en sólo el 23% de las 100 cepas estudiadas. Sin embargo, los autores demostraron la amplificación de los genes *hyl P* y *hyl P2* por PCR en el 97% de las cepas, demostrando la existencia de genes presentes en el genoma de fagos lisogénicos que codifican la actividad hialuronidasa.

De esta manera, durante una infección, los fagos lisogénicos pueden ser inducidos, resultando en la lisis del microorganismo y liberación de partículas de fago y hialuronidasa libre. La enzima extracelular puede contribuir a la dispersión de los microorganismos como resultado del incremento de la permeabilidad del tejido conectivo. Sin embargo, el rol de la hialuronidasa que permanece unida ó es parte integral del fago podría ser penetrar la cápsula bacteriana para permitir el acceso de la partícula viral a los receptores de una nueva célula de estreptococo (Hynes *et al.*, 1995).

Por otra parte, los resultados descritos en una investigación llevada a cabo por Matthews *et al* (1994) muestran que esta enzima es capaz de inhibir la proliferación de una línea celular mamaria. Estos resultados permiten hipotetizar sobre la existencia de potenciales factores de virulencia expresados *in vivo* con capacidad para inhibir la diferenciación y crecimiento del tejido mamario

En este estudio, 6 de las 13 cepas de origen clínico y 12 de las 30 cepas subclínicas presentaron capacidad de producir cápsula y hialuronidasa. Estos resultados muestran el dilema planteado, aunque no explicado, ante la producción de hialuronidasa y de una cápsula de ácido hialurónico.

Además, se identificaron los fenotipos cápsula (+) hialuronidasa (-) y cápsula (-) hialuronidasa (+).

## 2.5. Proteasa

Se determinó la producción de proteasa por el método descrito por Ashbaugh *et al* (1998). La Figura 11 muestra los halos de aclaramiento resultantes de la producción de proteasa en cepas de campo.

Nueve (69,2%) de los 13 aislamientos de *S. uberis* de origen clínico y 28 (93,3%) de los 30 provenientes de casos de mastitis subclínica resultaron positivos para la producción de proteasa (Tablas 6).

A partir del análisis de los resultados presentados en las Tablas 6, se puede observar que la mayoría de los aislamientos de *S. uberis*, 8 (61,5%) y 18 (60%) de origen clínico y subclínico, respectivamente, muestran producción tanto de proteasa como de factor activador de plasminógeno. De esta manera, la actividad caseinolítica en presencia de plasminógeno es atribuida a la acción del factor activador de plasminógeno, mientras que en ausencia de plasminógeno se debería a la presencia de otra proteasa distinta de plasmina

Burns *et al.*(1996) han descrito una cisteín proteasa en *S. pyogenes* con capacidad de activar a una metaloproteasa presente en las células endoteliales humanas contribuyendo así, al daño de células endoteliales y destrucción de tejidos. Sin embargo, en *S.uberis* no se ha informado la producción de proteasas distintas al FAP.

## 2.6. Producción de hemolisinas

En este estudio, se determinó la producción de  $\alpha$ -hemólisis ó  $\delta$ -hemólisis (no hemólisis) en el medio ATS suplementado con 5% de sangre ovina en aerobiosis, ya que según Facklam R.(2002) la composición del medio, incluyendo el tipo de sangre y la atmósfera de incubación pueden influenciar la producción de  $\alpha$  hemólisis.

Aunque los primeros estudios realizados en *S. uberis* describen a la  $\alpha$ -hemólisis (hemólisis parcial) y a la  $\delta$  hemólisis (no hemólisis) como características de las cepas de esta especie (Facklam, 2002), no está documentado la identificación de una enzima o toxina específica que afecte a los glóbulos rojos. El viraje al color verde en la zona que rodea a la colonia se debe principalmente a la producción de peróxido de hidrógeno por los estreptococos (Figura 12), lo que provoca la destrucción parcial de los glóbulos rojos con liberación de hemoglobina en el medio (Facklam, 2002). El peróxido no se forma si el oxígeno es removido de la atmósfera de crecimiento.

Aunque los estudios llevados a cabo por Barnad y Stinson (1996) con *S. gordonii* aportaron evidencia que la  $\alpha$  hemolisina consiste en la actividad del peróxido de hidrógeno sobre la membrana de los eritrocitos. Estos hallazgos no han sido generalmente aceptados debido a que el agar sangre contiene catalasa, la cual inactivaría al peróxido a medida que se va produciendo. No obstante, la catalasa de los eritrocitos posee baja afinidad por esta sustancia, permitiendo que el peróxido se acumule en el medio y sea la causa del daño oxidativo correspondiente a la  $\alpha$ -hemólisis.

Sin embargo, el rol del peróxido de hidrógeno en la patogénesis ha sido reconocido por varios autores. Duane *et al* (1993), demostró que *S. pneumoniae* produce peróxido de hidrógeno en concentraciones citotóxicas para una línea celular de epitelio alveolar tipo II de rata, por lo tanto el peróxido de hidrógeno

podría estar involucrado en la injuria celular provocada por la bacteria causante de la neumonía pneumocócica.

Por otra parte, evidencias de que peróxido es la causa de la muerte celular de fibroblastos humanos *in vitro* fueron aportadas por Simon *et al* (1981). Así también Tenovuo y Larjava (1984) reportaron la toxicidad del peróxido de hidrógeno frente a fibroblastos gingivales humanos cultivados *in vitro*.

Por lo antes expuesto, se estudió el tipo de hemólisis producido por las cepas de campo. Todas ellas resultaron  $\alpha$ -hemolíticas, excepto una no hemolítica de origen clínico (Tabla 6). Estos resultados son similares al 84,8% de cepas  $\alpha$ -hemolíticas identificadas por Watts (1988) a partir del análisis de 33 cepas de *S. uberis*, las cepas restantes fueron no hemolíticas.

En un estudio realizado por Khan *et al.* (2003) sobre un total de 132 cepas obtenidas de 58 establecimientos con mastitis clínica y subclínica de Alemania, el 95% de las cepas de *S. uberis* resultaron  $\alpha$ -hemolíticas y tan solo un 4,5%  $\delta$ -hemolíticas.

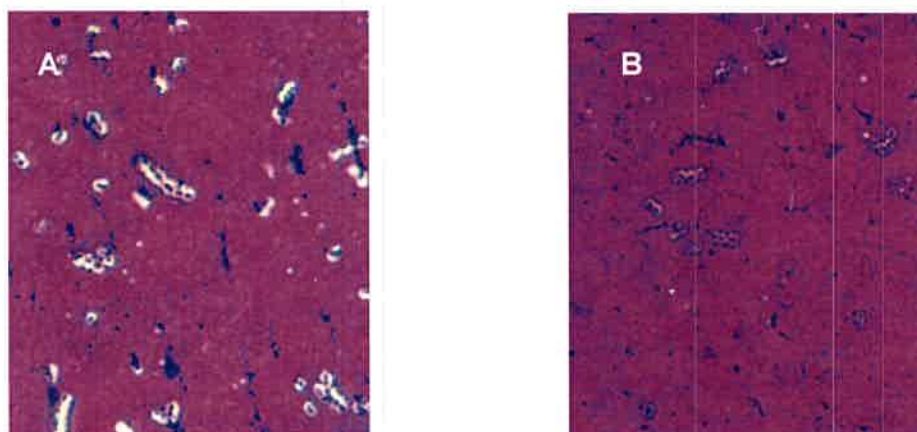


Figura 7. Observación microscópica de cápsula mediante la tinción de Anthony.  
(A): *S. uberis* UT 101 productora de cápsula; (B): *S. uberis* UT 102 no productora de cápsula

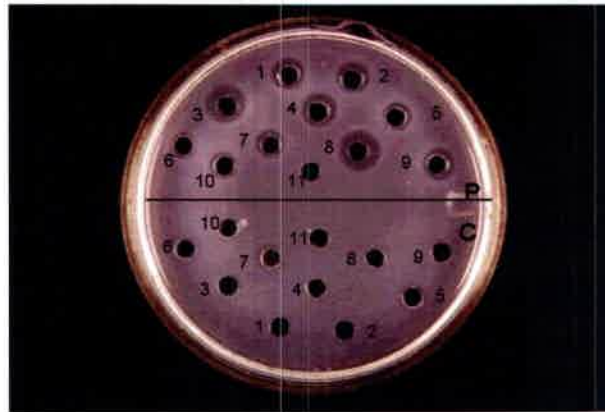


Figura 8. Actividad caseinolítica por activación del plasminógeno a plasmina.  
P y C: sobrenadantes de cultivos con y sin plasminógeno respectivamente

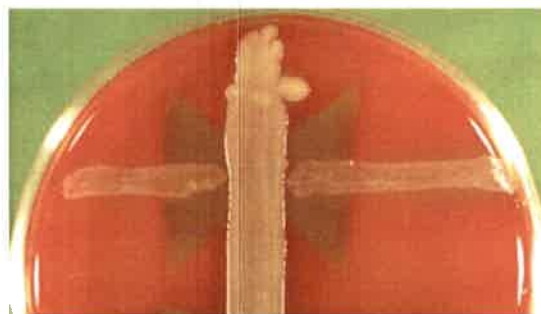


Figura 9. Factor uberis. A: *Staphylococcus aureus* ; B: *Streptococcus uberis*.

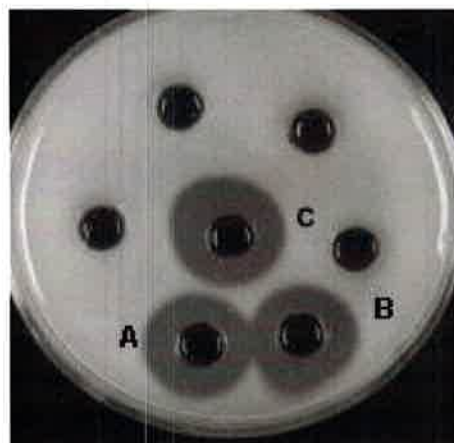


Figura 10. Producción de hialuronidasa. C: Control (+); A y B: cepas de campo: (+)



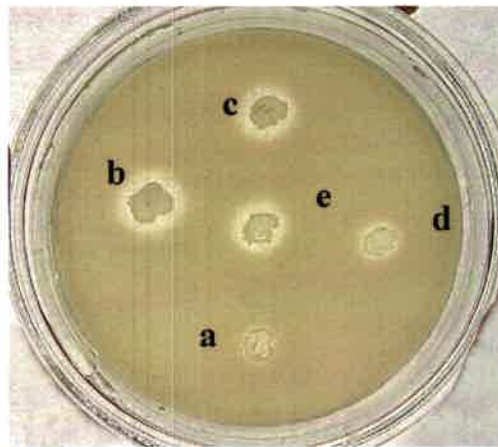


Figura 11. Producción de Proteasa en medio agarosa-leche: a: (-); b-d: (+)

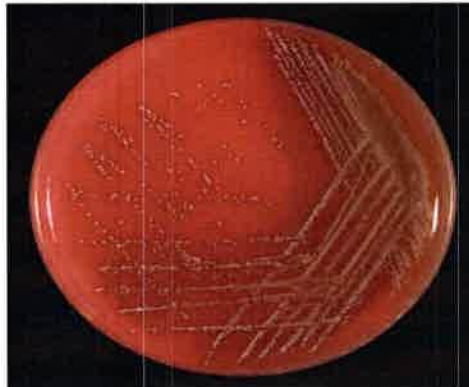


Figura 12. Producción de  $\alpha$  hemólisis por cepas de *S. uberis*

## 2.7. Perfiles de Virulencia

Del análisis de los seis factores de virulencia expresados *in vitro* analizados en 43 cepas de *S. uberis*, se determinaron 17 perfiles diferentes (a – q). Las cepas de origen clínico presentaron 10 perfiles, siendo “e” el perfil de mayor frecuencia (4/13) (Tabla 6).

Se identificaron 11 perfiles en las 30 cepas de origen subclínico. Seis cepas fueron caracterizadas como pertenecientes al perfil “l” y cuatro a los perfiles “e”, “g” y “n”, respectivamente (Tabla 6).

El perfil “e” caracterizado por la producción de hialuronidasa, FAP, cápsula, proteasa y hemólisis fue identificado en 8 de las 43 cepas, no pudiéndose asociar este perfil a la naturaleza clínica o subclínica de la enfermedad (Tabla 6).

Así también, los perfiles g, i y n fueron identificados tanto en cepas de origen clínico como subclínico (Tabla 6).

Tabla 6. Perfiles de virulencia de *S. uberis* de origen clínico y subclínico.

Perfil de Virulencia	Hialuron.	Factor uberis	FAP	Cápsula	Proteasa	Hemólisis	Nº de cepas
a	0	0	0	0	0	HP	1 (1;0)
b	0	0	1	0	0	HP	1 (1;0)
c	0	0	1	1	0	HP	1 (1;0)
d	0	0	1	0	1	HP	3 (0,3)
e	1	0	1	1	1	HP	8 (4,4)
f	0	1	1	1	1	HP	1 (1;0)
g	1	0	0	1	1	HP	5 (1;4)
h	1	1	1	1	1	HP	1 (1;0)
i	1	1	0	0	1	HP	2 (1;1)
j	1	0	1	0	0	NH	1 (1;0)
k	1	1	0	1	1	HP	2 (0;2)
l	1	0	1	0	1	HP	6 (0;6)
m	1	0	1	0	0	HP	2 (0;2)
n	0	0	1	1	1	HP	5 (1;4)
o	0	0	0	0	1	HP	2 (0;2)
p	0	1	0	0	1	HP	1 (0;1)
q	0	0	0	1	1	HP	1 (0;1)

Hialuron.; hialuronidasa; HP: Hemólisis parcial, NH: No Hemólisis, FAP: Factor activador de plasminógeno. Resultados: positivo,1; Negativo, 0.  
Nº de cepas: Total(cepas clínicas, cepas subclínicas)

Resulta interesante destacar que el cuadro clínico fue desarrollado tanto por una cepa con capacidad para expresar *in vitro* todos los factores de virulencia analizados (perfil h), como por una cepa productora sólo de  $\alpha$ -HEM (perfil a).

Del análisis de los resultados obtenidos se determinó la ausencia de asociación entre los perfiles correspondientes a los factores de virulencia y la naturaleza clínica o subclínica de la enfermedad.

De esta manera la presencia de potenciales factores de virulencia no investigados en este estudio podrían dar cuenta de la naturaleza clínica o subclínica de la mastitis.

### 3. Electroforesis de campos pulsantes

Dada la marcada variabilidad fenotípica en la expresión de los factores de virulencia se determinaron los perfiles genéticos de las cepas mediante la electroforesis de campos pulsantes (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) a los efectos de establecer posibles relaciones entre el origen clínico o subclínico de la mastitis ó la expresión *in vitro* de los determinantes de la virulencia estudiados.

Se realizó el análisis por PFGE a 32 de las 43 cepas de *S. uberis*, 9 clínicas y 23 subclínicas. El criterio de selección adoptado consistió en analizar al menos una cepa por cada perfil de virulencia identificado.

Como marcador de peso molecular se utilizó una cepa de campo, *S. uberis* 155/2, a la cual se le determinó el peso molecular de las bandas usando como marcador a la cepa *S. aureus* ISP 479C, cuyo perfil genético y tamaño de los fragmentos de restricción fueron determinados por Giraudo *et al.*, (1999)

Así, *S. uberis* 155/2 fue utilizada como marcador en cada gel para investigar el peso molecular de los fragmentos de ADN de las restantes cepas de campo (Figura 13).

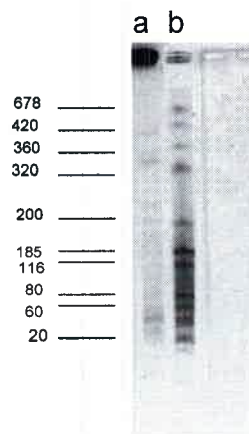


Figura 13. Análisis por PFGE del ADN cromosomal digerido con *Sma*I :a) cepa de *S. uberis* 155/2; b) cepa *S. aureus* ISP 479C

Los perfiles que presentaron un patrón de bandas idéntico, tanto en número como en peso molecular, fueron identificados con una letra mayúscula. Los perfiles que difieren del perfil inicial en 1 a 3 bandas fueron identificados con la misma letra mayúscula y una letra minúscula como subíndice. La misma letra mayúscula y un número como subíndice fue asignado a los perfiles que se diferencian del perfil inicial en 4 a 6 bandas. Los patrones que presentan 7 ó más bandas distintos al perfil inicial fueron identificados con otra letra mayúscula.

Los tambos 1-7, 8-17 y 18-19 pertenecen a las provincias de Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba, respectivamente.

Del análisis de los perfiles genéticos de 5 cepas de *S. uberis*, tres cepas presentan un perfil idéntico (C), y las dos cepas restantes muestran dos perfiles diferentes, B y D (Figura 14- 1).

En la Figura 14-2 se presenta el perfil exhibido por 5 cepas de campo, donde cuatro de ellas comparten un perfil idéntico (E), mientras que la cepa restante muestra un perfil (Ea) que difiere en un fragmento con relación al perfil E.

Dos de los perfiles (G) obtenidos mediante PFGE de 4 cepas de *S. uberis* resultaron idénticos, mientras los dos restantes fueron diferentes (F y H) (Figura 14-3 ).

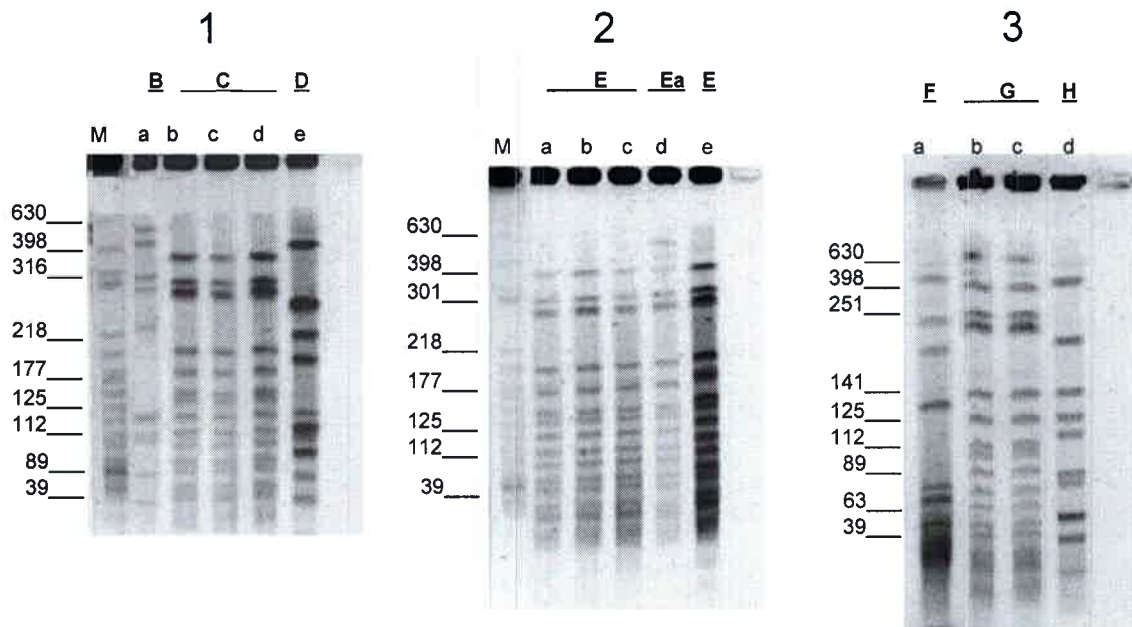


Figura 14. Análisis por PFGE de cepas de *S. uberis*. aisladas de infecciones intramamarias

M: Marcador de peso molecular

Gel 1: Cepas: a) 31(3-1); b) IR23; c) 180 (1-4); d) 5(1-4) ; e) IR47.

Gel 2: Cepas: a) IR16; b) 45(1-4); c) 73(3-6); d) 776 a; e) 89 (2-5)

Gel 3: Cepas: a) 397; b) 80 (3-8); c) 44 (2-5); d) 80 (2-5).

Los perfiles genéticos de 9 cepas de *S. uberis* analizadas mediante PFGE se muestran en la Figura 15-1. Dos de 6 cepas presentan perfiles idénticos (L), tres cepas presentan un perfil ( $L_a$ ) que difiere en al menos un fragmento con relación al perfil L, y la cepa restante exhibe un perfil ( $L_1$ ) que difiere en 6 bandas del perfil L. Las cepas restantes muestran distintos perfiles moleculares (I, J y K).

La Figura 15-2 muestra los perfiles genéticos correspondientes a 8 cepas de campo. Dos de ellas presentan perfiles indistinguibles (M), mientras 5 cepas exhiben un perfil genético ( $M_1$ ) que difiere del perfil M en 4 fragmentos. La cepa restante muestra un perfil (N) que se distingue en 7 ó más bandas del perfil M.

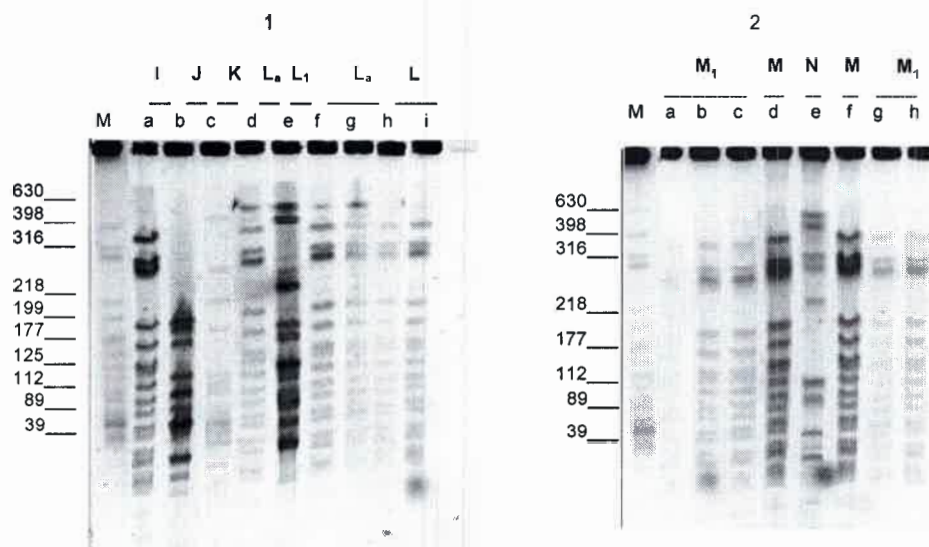


Fig 15. Análisis por PFGE de *S. uberis*. aisladas de infecciones intramamarias

M: Marcador de peso molecular

Gel 1: a) 33/2 ; b) 218 (1-7); c) 78 (1-7); d) IR25; e) 928/4; f) IR46; g) 57; h) 73 (1-7); i) 72 (1-1).

Gel 2: a) 1690; b) 191 (1-7); c) 8 (1-1); d) 12; e) 19 (1-1); f) 69 (1); g) 251/2; h) IR 24.

Del análisis de los perfiles genéticos de las 32 cepas de *S. uberis*, se determinaron 9 a 17 fragmentos de macrorrestricción obtenidos por PFGE.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos mediante la misma endonucleasa *Sma*I por Puetktes *et al.*, (2001) quienes informaron 8 a 14 fragmentos del estudio de 62 cepas de *S. uberis* con fines epidemiológicos. Por otra parte Gillespie y Oliver (2004) detectaron la presencia de 10 a 20 fragmentos, investigando 46 cepas de esta misma especie.

Los fragmentos presentaron pesos moleculares de 20 a 680 Kb. Los valores correspondientes a los fragmentos de bajo peso molecular (20 Kb) coinciden con los informados por los autores (Puetktes *et al.*, 2001; Gillespie y Oliver, 2004), mientras que aquellos que corresponden a las bandas de elevado peso (680 Kb) son superiores a los presentados por dichos autores.

Tabla 7. Naturaleza de la mastitis, origen, perfil de virulencia y perfil genético de cepas de *S. uberis* aisladas de infecciones intramamarias

Cepas	Origen	Tambo	Procedencia	Perfil PFGE	Perfil de virulencia
155-2	S	6	Santa Fe	A	n
31 (3-1)	S	7	Bs. As.	B	o
IR23	C	1	Santa Fe	C	c
180 (1-4)	S	11	Bs As	C	n
5 (1-4)	S	11	Bs. As	C	d
IR47	C	2	Santa Fe	D	n
IR16	C	17	Córdoba	E	e
45(1-4)	S	10	Bs As	E	g
73(3-6)	S	13	Bs As	E	g
776a	S	3	Santa Fe	E <sub>a</sub>	p
89 (2-5)	S	12	Bs. As	E	l
397	C	14	Bs As	F	h
80 (3-8)	S	10	Bs As	G	e
44 (2-5)	S	12	Bs As	G	o
80 (2-5)	S	12	Bs As	H	d
33/2	S	16	Córdoba	I	i
218 (1-7)	S	9	Bs As	J	m
78 (1-7)	C	9	Bs As	K	b
IR25	C	4	Santa Fe	L <sub>a</sub>	e
928/4	S	16	Córdoba	L <sub>1</sub>	l
IR46	C	2	Santa Fe	L <sub>a</sub>	a
57	S	5	Santa Fe	L <sub>a</sub>	m
73 (1-7)	S	9	Bs As	L	n
72 (1-1)	S	8	Bs. As	L	n
1690	C	15	Bs As	M <sub>1</sub>	g
191 (1-7)	S	9	Bs As	M <sub>1</sub>	l
8 (1-1)	S	8	Bs As	M <sub>1</sub>	q
12	S	5	Santa Fe	M	d
19 (1-1)	S	8	Bs As	N	g
69/1	S	16	Córdoba	M	e
251-2	S	6	Bs. As	M <sub>1</sub>	k
IR24	C	18	Córdoba	M <sub>1</sub>	j

El análisis comparativo de los perfiles genotípicos permitió identificar cepas de origen clínico y subclínico con patrones de bandas idénticos, en particular, tres cepas, una clínica y dos subclínicas, comparten un único perfil genético (C). Igual comportamiento fue observado en cepas de diferentes orígenes con perfil E, L<sub>a</sub> y

M<sub>1</sub> (Tabla 7). De esta manera, no fue posible establecer asociaciones entre los perfiles genéticos y el origen clínico o subclínico de las cepas aisladas de casos de mastitis. Estos hallazgos coinciden con los resultados informados por Phuektes *et al.*, (2001), quienes mostraron idénticos perfiles genéticos obtenidos por PFGE de cepas de *S. uberis* aisladas de cuartos con infección clínica y subclínica de 4 rodeos lecheros en Australia. Los resultados presentados en este estudio acuerdan con lo informado por Jayarao *et al.* (1993), quienes mostraron que la mayoría de las cepas de *S. uberis* aisladas de mastitis clínica fueron también aisladas de vacas con mastitis subclínica.

El análisis de los perfiles de restricción permitió determinar patrones de bandas idénticos en cepas con diferente perfil de virulencia. Así, tres cepas con diferentes perfiles de virulencia (c, n y d) presentaron idéntico perfil de bandas (C). Cinco cepas con un único perfil genético M<sub>1</sub> presentan cinco perfiles de virulencia diferentes (g, l, q, k y j) (Tabla 7). Igual comportamiento fue presentado por 2, 3 y 2 cepas con los perfiles genéticos G, L<sub>a</sub> y M, respectivamente.

Por otro lado, dos de cuatro cepas con un perfil de virulencia idéntico (n) comparten un único perfil genético (L); así también, dos de cuatro cepas que presentaron un único perfil de virulencia (g) mostraron identidad en su perfil genético E.

Las restantes trece cepas exhibieron perfiles genéticos diferentes con distintos perfiles de virulencia (Tabla 7).

De esta manera, el análisis de los resultados obtenidos muestran que no fue posible, establecer asociaciones entre los perfiles genéticos y los perfiles de virulencia en la mayoría de las cepas.

En este estudio se determinaron 14 perfiles genéticos A a N, a partir del análisis por PFGE de 32 cepas de campo. Si bien el reducido número de cepas analizadas en cada establecimiento lechero no permite concluir acerca de la variación genética entre cepas del mismo tambo. En este sentido, varios autores han informado una vasta heterogeneidad en cepas de *S. uberis* con capacidad de



infectar las ubres de los animales desde una variedad de fuentes del medio ambiente. (Baseggio *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2003; McDougal *et al.*, 2004)

McDougal *et al.*, (2004) informaron el aislamiento de 283 cepas no relacionadas epidemiológicamente sobre un total de 342 aislados provenientes de 8 granjas. En el mismo sentido, Khan *et al.*, (2003) reportaron 55 patrones de PFGE de 69 cepas de *S. uberis* aisladas de 93 rodeos.

Asimismo, Baseggio *et al.*, (1997) en un estudio de 10 establecimientos lecheros, encontraron una mayor diversidad en esta especie con relación a *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae*

No obstante, los resultados del presente estudio también muestran la presencia de perfiles genéticos idénticos ó estrechamente relacionados en cepas aisladas de tambos situados en diferentes provincias. Tres cepas provenientes de establecimientos lecheros de Buenos Aires y Santa Fe presentaron un único perfil C. De igual manera, cepas pertenecientes al perfil M<sub>1</sub> fueron aisladas de rodeos de ambas provincias. El perfil M fue identificado en una cepa aislada de Santa Fe y otra de Córdoba.

La similitud genética encontrada en cepas provenientes de diferentes rodeos parece coincidir con las investigaciones realizadas en un estudio longitudinal por Phuetktes *et al.*, (2001) en 65 cepas de *S. uberis*, aisladas de cuartos individuales de 8 vacas durante dos lactaciones sucesivas en cuatro rodeos. Los autores informaron sobre la existencia de dos a seis cepas de un rodeo con perfiles indistinguibles a los de las cepas de los 3 rodeos restantes.

En este estudio también se encontraron 2 cepas idénticas (perfil C) en un mismo tambo. Estos resultados coinciden con lo informado por Phuetktes *et al.* (2001), lo cual podría ser atribuido a la transmisión directa de una vaca a otra durante el proceso de ordeño ó a la infección de diferentes animales por la misma cepa desde una fuente común.

En general, los hallazgos muestran una marcada heterogeneidad genética entre los aislamientos de *S. uberis*, a pesar de la existencia de un número reducido de cepas con similitud genética tanto dentro como entre rodeos.

### 3.1. Análisis por taxonomía numérica

A partir de los perfiles genotípicos obtenidos por macrorestricción del ADN, se estimó el porcentaje de similitud entre dos cepas por medio del coeficiente de Dice. El análisis de cluster de matrices de similitud fue realizado por el método UPGMA, el que permitió la construcción de un dendrograma y la determinación de similitudes.

Del análisis del dendrograma se identificaron 6 clusters (I-VI) constituido por cepas con 100% de similitud genética. La mayoría de las cepas con similitud genética proceden de diferentes tambos pertenecientes a diferentes provincias y poseen diferentes perfiles de virulencia; sólo las cepas 180(1-4) y 5(1-4) con un 100% de similitud genética, comparten el origen subclínico y el tambo de procedencia, y difieren en el perfil de virulencia. Así, se podría especular sobre la existencia de cepas con un mismo origen clonal, aunque con capacidad de expresar diferentes factores de virulencia bajo la inducción de distintas señales del medio ambiente.

En general, no se encontró relación entre los perfiles genotípicos y los perfiles de virulencia, origen clínico o subclínico ó tambo de procedencia. Sólo dos pares de cepas 45(1-4) y 73(3-6), y 73(1-7) y 72(1-1) pertenecientes a 2 clusters diferentes presentaron 100% de similitud genética dentro de cada cluster, e idéntico perfil de virulencia y origen subclínico, aunque difieren en los tambos de procedencia.

El dendrograma resultante confirmó la marcada diversidad genética mediante el análisis de los perfiles genéticos obtenido mediante PFGE (Figura 16).

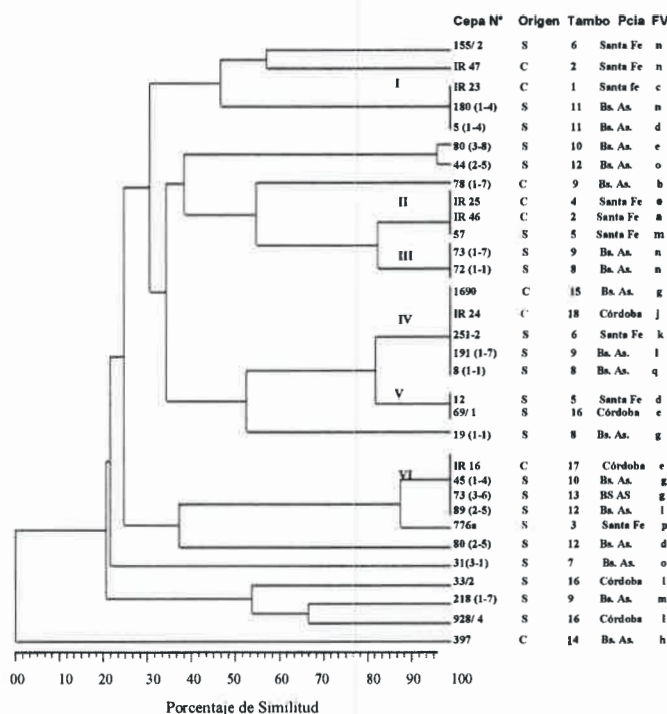


Figura 16. Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGA basado en el coeficiente de Dice por la comparación de perfiles de PFGE de cepas de *S. uberis* con el origen, tambo, procedencia y perfil de virulencia. S: subclínico, C: clínico. Tambos: 1-7, 8-17 y 18-19 pertenecientes a Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba, respectivamente. a – q: Perfiles de virulencia

#### 4. Detección de genes de virulencia por la técnica de amplificación por PCR

Para investigar la presencia de los genes de virulencia se seleccionaron 8 cepas con capacidad para producir de 1 a 4 factores de virulencia, con diferentes perfiles de virulencia. Tres de las cepas (12, 57 e IR46) pertenecientes a los perfiles genéticos (L y M) de mayor frecuencia de aislamiento, mientras que las cinco restante, estaban incluidas en perfiles genéticos menos frecuentes (Tabla 8).

Tabla 8. Características de las cepas seleccionadas para determinar genes de virulencia

Cepas	Perfil de Virulencia						Perfil PV PFGE	
	Hialuron	Factor uberis	FAP	Cápsula	Proteasa	Hemólisis		
IR47	-	-	+	+	+	HP	n	D
89(2-5)	+	-	+	-	+	HP	l	E
12	-	-	+	-	+	HP	d	M
80(2-5)	-	-	+	-	+	HP	d	H
IR23	-	-	+	+	-	HP	c	C
57	+	-	+	-	-	HP	m	L <sub>a</sub>
218(1-7)	+	-	+	-	-	HP	m	J
IR46	-	-	-	-	-	HP	a	L <sub>a</sub>

FAP: Factor activador del plasminógeno; Hialuron.: hialuronidasa; HP: hemólisis parcial; PV: perfil de virulencia; PFGE: perfil obtenido por PFGE.

#### 4.1. Determinación de genes asociados a virulencia

Las 8 cepas seleccionadas fueron investigadas con relación a la presencia de los genes de virulencia asociados a la expresión de cápsula, factor activador de plasminógeno y factor uberis mediante PCR.

#### 4.2. Factor uberis

Se realizó la amplificación del gen asociado a la producción de factor uberis (*cfu*). El análisis se llevó a cabo en las 8 cepas de campo según el protocolo propuesto por Jiang *et al.* (1996).

No se detectó amplificación del gen *cfu* en ninguna de las 8 cepas analizadas en ensayos realizados por triplicado. En cada ensayo, se utilizó como

control positivo una cepa de *S. uberis*, proveniente del banco de cepas del laboratorio de Genética Microbiana, con capacidad de producir factor uberis. Esta cepa presentó un producto de amplificación del gen *cfu* de 680 pb. La cepa *S. uberis* NCDO2038 negativa para el factor uberis no presentó producto de amplificación (Hassan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2003) (Figura 17).

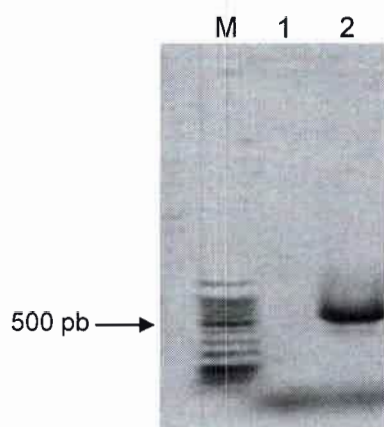


Figura 17: Producto de amplificación del gen *cfu* obtenido mediante PCR en cepas de *S. uberis*. Calles 1-2: NCDO 2038 (-) y cepa control (+), respectivamente. M: marcador de PM: Ladder 100 pb.

La Tabla 9 presenta los genotipos obtenidos en las cepas de *S. uberis* con relación al factor uberis. De esta manera, los resultados permitieron confirmar la ausencia del gen *cfu* en las cepas que mostraron incapacidad para expresar *in vitro* este factor.

Jiang *et al.* (1996) informaron que el factor uberis regulado por la presencia del gen *cfu* está restringido a un reducido número de aislamientos. La baja frecuencia de expresión de este factor ha sido corroborado en un estudio realizado en 130 cepas de *S. uberis* por Khan *et al.* (2003). Los autores identificaron la presencia de un producto de amplificación correspondiente al gen *cfu* en 5 cepas positivas para el factor uberis, mientras que no detectaron amplificación en las 125 cepas que mostraron incapacidad para expresar *in vitro* el factor,

Tabla 9. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas seleccionadas

Cepas	Hialuronidasa	Factor Uberis	FAP	Cápsula*	Proteasa	Hemolisina	Internalización **
	Fenotipo	Fenotipo/Genotipo	Fenotipo/Genotipo	Fenotipo/Genotipo	Fenotipo	Fenotipo	Fenotipo
IR23	-	-/-	+/-	+/+	-	HP	++
IR47	-	-/-	+/+	+/+	+	HP	++
IR 46	-	-/-	-/-	-/-	-	HP	++
12	-	-/-	+/-	-/-	+	HP	+
57	+	-/-	+/-	-/-	-	HP	+
218 (1-7)	+	-/-	+/-	-/-	-	HP	+
80 (2-5)	-	-/-	+/-	-/+	+	HP	+
89 (2-5)	+	-/-	+/-	-/-	+	HP	+

Expresión fenotípica de cápsula en agar sangre. \*\* Internalización de *S. uberis* en MAC-T.

(+):  $< 4,3 \times 10^1$  UFC/ml; (++): $< 1,3 \times 10^2$  UFC/ml

### 4.3. Cápsula

Se realizó la amplificación de los genes asociados a la producción de cápsula (*hasA*, *hasB*, *hasC*) mediante PCR, utilizando los pares de cebadores que se detallan en Materiales, tabla 1 y el programa descritos por Ward y Leigh (2002) y Field *et al.* (2003), presentado en Métodos (Tabla 3).

La amplificación de las secuencias, *hasAB*, se realizó mediante PCR múltiple, una única reacción, con los 2 pares de cebadores correspondientes. La cepa *S. uberis* UT101 capsulada presentó dos amplicones, uno de aproximadamente 300 pb para *hasA* y otro ligeramente superior a 500 pb para *hasB*, mientras que la cepa UT102 no capsulada no mostró amplificación de ambos genes (Figura 18, calles 1 y 2).

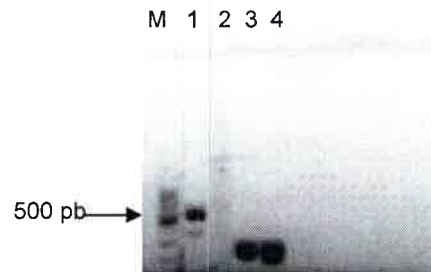


Figura 18. Productos de amplificación de *hasAB* y *hasC* de las Cepas de Referencia.  
 Calles 1 y 2: *hasAB*. *S. uberis* UT101 y UT 102, respectivamente.  
 Calles 3 y 4: *hasC*. *S. uberis* UT101 y UT 102, respectivamente

Los resultados obtenidos de ensayos realizados por triplicado muestran que tres de las 8 cepas seleccionadas presentaron los dos amplicones con idéntico peso molecular a los descritos para la cepa de referencia (Figura 19, I). De esta manera, los productos de amplificación obtenidos coinciden con los informados por Field *et al.* (2003), de 319 pb y 532 pb para *hasA* y *hasB*, respectivamente.

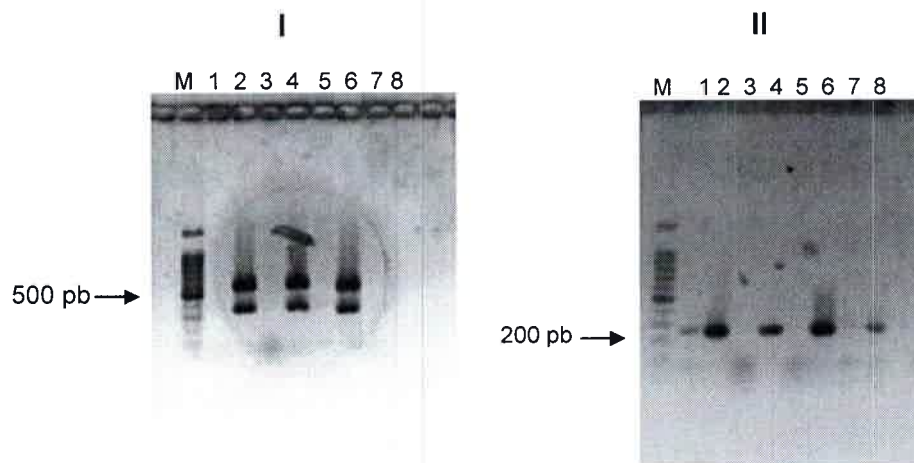


Figura 19. Producto de amplificación del gen *hasAB* ( I ) y del gen *hasC* ( II ) obtenido mediante PCR.  
 Calles 1-8: *S. uberis*: 12, IR 23, IR46, IR47, 57, 80(2-5), 89(2-5) y 218(1-7). M: marcador 100 pb

Luego, para la determinación del gen *hasC* se realizó una reacción de PCR simple con el par de cebadores presentados en la tabla 1 de Materiales. El

programa utilizado fue idéntico al empleado para la reacción de PCR Múltiple. Las cepas *S. uberis* UT101 y UT102 presentaron un amplicón de aproximadamente 200 pb para *hasC* (Figura 18, calles 3 y 4).

De esta manera, la presencia de los amplicones correspondientes a los genes *hasA*, *hasB* y *hasC* en la cepa *S. uberis* UT101 capsulada y del producto de amplificación del gen *hasC* en la cepa UT102 coincide con los hallazgos de Ward *et al* (2001).

Los resultados obtenidos de la determinación del gen *hasC* de los ensayos realizados por triplicado muestran que cinco de las 8 cepas presentaron un amplicón con idéntico peso molecular al descrito para la cepa de referencia. Así, el producto de amplificación obtenido coincide con el informado por Field *et al.* (2003) (Figura 19. II).

Los autores revelaron en un estudio dirigido a identificar los genes responsables de la formación de cápsula en *S. uberis* que la presencia de *hasA* y *hasC*, codificantes de las enzimas hialuronato sintetasa y UDP- glucosa pirofosforilasa, respectivamente, son esenciales para su producción.

En el estudio realizado en 180 cepas de *S. uberis* por Field *et al* (2003) se determinó que el genotipo *hasABC* fue el de mayor frecuencia de aislamiento, seguido por el genotipo *hasC* en segundo lugar.

Sin embargo, Coffey *et al* (2006) y Pullinger *et al.*, (2006) atribuyen el carácter capsular exclusivamente al gen *hasA*.

La Tabla 9 presenta los genotipos obtenidos en las cepas de *S. uberis* con relación al carácter capsular. En los resultados obtenidos, sólo dos (IR23, IR47) de las tres cepas que amplificaron *hasA*, fueron capaces de producir cápsula *in vitro* . La cepa restante 80(2-5) con genotipo *hasA* + (Figura 19,I) no mostró cápsula cuando fue ensayada bajo idénticas condiciones de cultivo.

Por ello, se decidió investigar la expresión de cápsula en las 6 cepas no capsuladas por cultivo en diferentes medios diseñados de manera de imitar las condiciones presentes *in vivo* y contribuir así, a su inducción (Matthews *et al.*, 1994a). La cepa UT102 con genotipo *hasC* + no fue capaz de inducir cápsula en



ninguno de los medios de cultivo ensayados, pero la cepa 80 (2-5) indujo la producción de cápsula.

Tabla 10. Genotipo y fenotipo capsular

	Controles		Mastitis Clínica			Mastitis Subclínica				
	UT101	UT102	IR23	IR46	IR47	12	57	80(2-5)	89(2-5)	218(1-7)
Fenotipo*	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Genotipo hasA/C	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+

Fenotipo\*: Cultivo en AS

Coffey *et al* (2006), informaron sobre la existencia de una correlación entre la expresión de *hasA* y el origen clínico de la mastitis en un estudio dirigido a conocer la estructura de la población de *S. uberis* mediante la técnica de tipificación basada en el secuenciamiento de varios loci (MLST). En el mismo sentido, las investigaciones realizadas por Pullinger *et al* (2006) con idéntica metodología determinaron que la mayoría de los miembros pertenecientes a un complejo clonal, definido por el conjunto de cepas que evolucionaron de una fundadora, concentra cepas no capsuladas aisladas de mastitis subclínica.

En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio muestran que dos de las tres cepas capsuladas proceden de casos clínicos de mastitis, mientras cuatro de las cinco cepas no capsuladas fueron aisladas de mastitis subclínica. En el presente estudio se observó coincidencia con lo descrito por Coffey *et al* (2006) y Pullinger *et al.*, (2006), a pesar del reducido número de cepas analizadas (Tabla 10).

#### 4.4. Factor Activador del Plasminógeno

Se realizó la amplificación de los genes asociados a la producción de factor activador del plasminógeno (*pauA* / *pauB*). El análisis de las 8 cepas de campo de *S. uberis* se realizó según el protocolo propuesto por Ward y Leigh (2002). Los cebadores se detallan en la sección Materiales, tabla 1 y el programa se presenta en Métodos tabla 3.

Los resultados obtenidos de ensayos realizados por triplicado muestran que un único producto de aproximadamente 1200 pb fue obtenido por amplificación del gen *pauA* en una de las 7 cepas con capacidad de expresar *in vitro* el factor activador del plasminógeno (Figura 20).

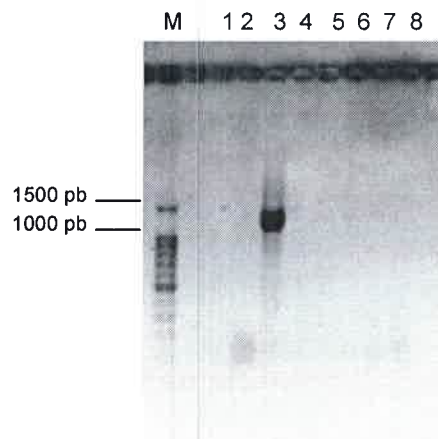


Figura 20: Producto de amplificación del gen *pauA* obtenido mediante PCR en cepas de *S. uberis*. Calles 1-8: IR46, 12, IR47, IR23, 57, 80(2-5), 89(2-5) y 218(1-7), M: marcador de PM :100 pb.

El amplicón obtenido corresponde al gen *pauA* en coincidencia con los resultados descritos por Ward y Leigh (2002), luego de la amplificación del ADN cromosomal que codifica para la proteína completa. Los autores determinaron la presencia de dos genes codificantes para el factor activador de plasminógeno,

*pauA* de 1200 pb, presente con mayor frecuencia, y *pauB* de 2100 pb, con baja frecuencia de expresión.

En este estudio, ninguna de las cepas analizadas presentó un amplicón de 2100 pb correspondiente a la amplificación del gen *PauB* (Figura 20). La Tabla 9 presenta los genotipos obtenidos en las cepas de *S. uberis* con relación al factor activador.

Los estudios realizados en otros países por varios autores muestran elevado porcentaje de cepas *pauA* positivas (Johnsen *et al.*, 1999; Ward y Leigh, 2002; Khan *et al.*, 2003). Así, en el Reino Unido, 88 de 112 aislamientos de *S. uberis* presentaron el gen *pauA* y ninguno de ellos presentó el gen *pauB* (Ward y Leigh, 2002). En Dinamarca, las 20 cepas aisladas de un rodeo resultaron *pauA* positivas y ninguna presentó el gen *pauB* (Ward y Leigh, 2002). Johnsen *et al.*, (1999) identificaron el gen *pauB* en sólo una cepa entre 11 aislados provenientes de otro rodeo danés.

Por el contrario, en este estudio el gen *pauA* fue identificado en sólo el 12.5% de las cepas, aunque se debe tener en cuenta el reducido número de cepas. Además, el gen *PauA* no fue ocupado por el gen alternativo *PauB* según la especulación propuesta por Ward y Leigh (2002). Los autores han planteado la hipótesis que sostiene que *pauB* conferiría poca ventaja a las cepas y su adquisición habría ocurrido recientemente, limitando así su distribución

Un estudio epidemiológico recientemente realizado en *S. uberis* según un esquema de tipificación basado en el secuenciamiento de varios loci, denominado Multilocus Sequence Typing (MLST) reveló características poblacionales particulares. Así, un mecanismo de transferencia génica horizontal y posterior selección positiva ha contribuido en esta especie a la adquisición o evolución de nuevos tipos alélicos para el gen *pauA* o activadores de plasminógeno alternativos (Zadoks *et al.*, 2005). Los hallazgos han evidenciado la presencia de 11 tipos alélicos diferentes correspondientes al gen activador del plasminógeno en 48 cepas de *S. uberis*.

De las 7 cepas con capacidad de producir FAP solo se detectó la presencia del gen *pauA* en la cepa IR47. No obstante la capacidad de activar el plasminogeno *in vitro* mostrada por las cepas 12, 80(2-5) y 89(2-5) en las que no se evidenciaron los genes *pauA* ni *pauB* podría atribuirse a la proteasa detectada en las placas de agarosa-leche (tabla 9).

La ausencia de amplificación del gen *pauA* mediante la técnica de PCR en las cepas 57, 218(1-7) e IR23, con capacidad de activar el plasminogeno *in vitro*, podría ser atribuido a la diversidad de tipos alélicos descritos para este gen (Zadock 2005). En este caso el diseño de nuevos cebadores podría permitir la obtención de productos de amplificación en estas cepas, y por ende la detección del gen *pauA*. De no obtenerse amplificación del gen, la técnica de Southern blot permitiría detectar la presencia del gen mediante el empleo de una sonda obtenida a partir del producto de amplificación del gen *pauA* de la cepa IR47.

## 5. Ensayo de internalización a células epiteliales mamarias

La habilidad de las cepas de *S. uberis* para invadir y permanecer dentro de las células del huésped fue evaluada por un ensayo de internalización a células epiteliales mamarias bovinas (MAC-T), según Almeida *et al.* (1999b).

Los ensayos fueron realizados con una multiplicidad de infección (MI) de 50:1 a 100:1, la cual representa la relación bacterias:células epiteliales. La Figura 21 muestra la capacidad de internalización de las cepas de *S. uberis*, expresado como el valor de la media de las UFC/ml y su correspondiente desvío estándar.

Si bien las 8 cepas de *S. uberis* ensayadas mostraron capacidad de internalización a las células epiteliales mamarias bovinas MAC-T, la figura 21 presenta los diferentes recuentos de células viables obtenidos para cada cepa a partir de la lisis de las células.

Las cepas IR23, IR46 e IR47 presentaron mayor capacidad de internalización al mostrar valores superiores a  $1 \times 10^2$  UFC/ml luego de 1 h de

infección. Si bien las cepas 12, 57, 80 (2-5), 89 (2-5) y 218 (1-7) fueron capaces de internalizar, los valores de UFC/ml fueron muy inferiores.

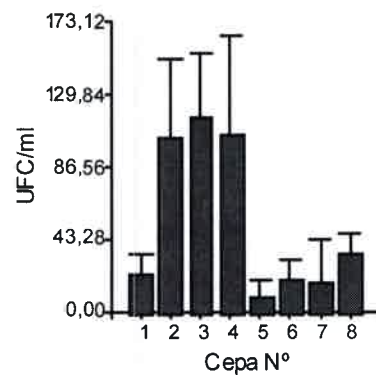


Figura 21. Internalización de *S. uberis* en células epiteliales mamarias bovinas MAC-T. Cepa 1: *S. uberis* 12; 2: IR23; 3: IR46; 4: IR47; 5: 57; 6: 80(2-5); 7: 89(2-5) y 8: 218(1-7). Datos representan la media y el desvío estándar de UFC/ml de las células internalizadas

La investigación realizada por Almeida *et al* (1999a) mostró valores del orden de 1 a 3 x 10<sup>2</sup> UFC/ml de *S. uberis* internalizadas en células MAC-T, aunque al cabo de 2 h del inicio de la infección.

Por otra parte también se demostró que los glicosaminoglicanos de las membranas eucariotas actuarían como receptores facilitando la adherencia e inducción de la internalización (Almeida *et al* 1999b). Matthews *et al.* (1994b) informaron que ocurren arreglos en el citoesqueleto de la célula eucariota, los cuales no incluyen fusión con lisosomas, lo que permitiría la internalización.

También se ha demostrado la sobrevivencia intracelular de *S. uberis* por más de 120 h, sin aparente pérdida de viabilidad, ni daño de la célula del huésped (Tamilselvam y Almeida, 2006, Almeida y Oliver, 2006). Además participa un mecanismo de transducción de señales, dado por quinasas del huésped en la internalización de *S. uberis* a las células epiteliales mamarias (Almeida *et al.*, 2000).

La invasión a células epiteliales mamarias bovinas representa una estrategia fundamental en el desarrollo de la patogénesis de *S. uberis*, ya que las bacterias

internalizadas están protegidas de los mecanismos de defensa del huésped y de la acción de los antimicrobianos. La habilidad de invadir el epitelio mamario puede resultar en una infección crónica y ser la causa de la falta de éxito en el control de la mastitis a *S. uberis*.

## **6. Estudio de la patogénesis temprana en mastitis experimental a *S. uberis* en cabras**

### **6.1. Selección de la cepa**

Para elucidar la patogénesis temprana y respuesta inflamatoria inducida en cabras por *S. uberis* se seleccionó una cepa con capacidad para expresar *in vitro* la mayoría de los factores de virulencia analizados además de presentar los genes de virulencia investigados.

La cepa seleccionada fue *S. uberis* IR47, aislada de mastitis clínica, además caracterizada por la expresión fenotípica de cápsula, factor activador del plasminógeno, proteasa y hemolisina, y por la presencia de los genes de virulencia *hasAB/C* y *pauA*.

### **6.2. Animales**

El ensayo de mastitis experimental se realizó en 6 cabras mediante la inoculación de  $1,7 \times 10^8$  UFC/ml de la cepa IR47 por vía intramamaria, en la glándula derecha de cada animal (glándula inoculada, GI). La glándula izquierda inoculada con solución fisiológica se usó como control (glándula no inoculada, GNI).



### 6.3. Observaciones clínicas

Para investigar la respuesta clínica provocada por la cepa IR47, las cabras fueron examinadas durante la experiencia mediante inspección visual y palpación de la ubre y medición de la temperatura rectal. No se observaron signos de edema en las glándulas inoculadas. Sólo dos cabras presentaron en la glándula derecha entre las 4 h y 12 h post-inoculación (pi) una respuesta clínica basada en calor y dolor. A partir de las 8 h pi se detectó un incremento de la temperatura rectal en 0.3°C a 1°C con relación a la temperatura al inicio del ensayo.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren a los informados por Pedersen *et al.* (2003). Los autores investigaron la patogénesis temprana y respuesta inflamatoria en bovinos durante 12 h luego de la inoculación de  $0.8 - 1 \times 10^7$  UFC de la cepa U103 aislada en Dinamarca de un caso de mastitis clínica. Si bien, tanto el origen de la cepa como la dosis utilizada fueron similares a la empleada en nuestro ensayo, se debe destacar que la especie animal utilizada fue distinta. Los autores informaron el desarrollo de una mastitis clínica en los 6 animales, caracterizada por signos inflamatorios progresivos, con una respuesta clínica máxima dentro de las 11 h pi.

En otra investigación llevada a cabo por Smits *et al.* (1998), reportaron sobre un ensayo de mastitis experimental en bovinos por inoculación de sólo  $5 \times 10^2$  UFC de la cepa 0140J de *S. uberis*, caracterizada por ser altamente capsulada y productora de factor activador del plasminógeno. En contraste con lo descrito en nuestro estudio, los autores informaron la inducción de mastitis clínica en los 5 animales utilizados con marcados signos clínicos locales entre las 24 h y 60 h pi, acompañado de disturbios sistémicos (fiebre, taquicardia, depresión).

En un estudio llevado a cabo por Bannerman *et al.* (2005) en bovinos durante 7 días, se desarrolló una mastitis clínica en el cuarto infectado de cada una de las 12 vacas utilizadas en el ensayo, luego de la inoculación de  $2,20 \times 10^2$  UFC de la cepa 0140J. A diferencia de nuestra investigación, los autores informaron una respuesta sistémica a partir de las 48 h, puesta de manifiesto

por una respuesta febril luego de las 30 h e incremento de la temperatura rectal durante todo el ensayo.

Rambeaud *et al.* (2003) realizaron un estudio de mastitis experimental mediante la inoculación de  $6,65 \times 10^3$  UFC a 5 vacas Jersey y de  $1,05 \times 10^4$  UFC a 5 vacas Holstein de la cepa UT888 de *S. uberis*. La misma fue aislada de mastitis clínica y caracterizada por su producción de cápsula, adhesión e internalización a células epiteliales mamarias bovinas. Al contrario de lo descrito en nuestro estudio, los autores informaron la inducción de mastitis clínica en 16 cuartos, con cambios significativos a nivel local (edema de la glándula y presencia de coágulos en la leche) y sistémico (elevación de la temperatura rectal) y máxima expresión a las 144 h del desafío.

Por último, Almeida *et al.* (2004) llevaron a cabo una investigación en 20 bovinos inoculados con  $6,8 \times 10^3$  UFC ó  $5,1 \times 10^3$  UFC de la cepa UT888. Los autores informaron, en contraste con los resultados de nuestro estudio, el desarrollo de mastitis clínica en la mayoría de los cuartos desafiados. La mastitis fue caracterizada por edema en la glándula mamaria y elevación de la temperatura rectal.

#### **6.4. Cambios de la secreción láctea**

En este ensayo no se detectaron cambios (coágulos, sangre, escamas) en las características de la secreción láctea. Por el contrario, varios estudios informaron la presencia de secreción mamaria con aspecto seroso ó coágulos en la leche ( Pedersen *et al.*, 2003; Rambeaud *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2004).

#### **6.5. Determinación del umbral del Recuento de Células Somáticas (RCS)**

Para determinar el umbral del RCS en leche a partir del cual se reconoce al animal libre de infección intramamaria, se investigó la distribución del valor del RCS en la leche de ambas glándulas de cada cabra de un total de 70, provenientes de un tambo situado próximo a la ciudad de Río Cuarto.



Se detectaron 7 cabras infectadas sobre un total de 70 cabras analizadas. Del análisis descriptivo de la distribución del valor del RCS se determinó que el 93% de las muestras de leche de las glándulas no infectadas presentaron un valor de RCS igual o menor a  $1,037 \times 10^6$  cél/ml (Figura 22). Las glándulas infectadas presentaron valores de RCS superiores a  $10^6$  cél/ml, aunque no se pudo inferir el RCS debido al reducido número de casos positivos.

Estos resultados coinciden con el valor umbral de  $10^6$  cél/ml establecido por Poutrel y Lerondelle (1983). De esta manera, se consideró que una cabra perteneciente al rodeo analizado se encuentra libre de inflamación cuando la muestra de leche posee un valor de RCS igual o menor a  $10^6$  cél/ml.

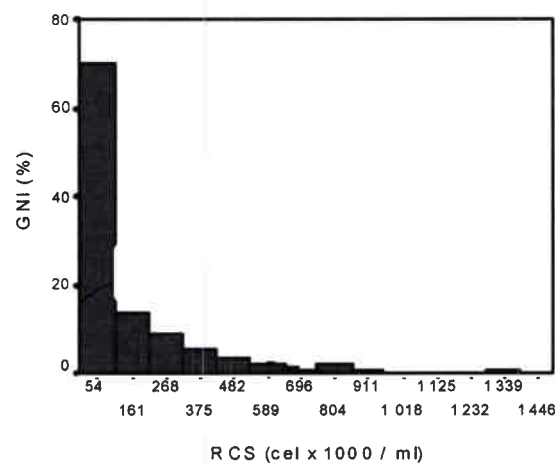


Figura 22: Distribución del valor del RCS de leche de glándulas no infectadas (GNI) de 63 cabras, mediante el Soft SPSS, versión 10.10.

## 6.6. Recuento de células somáticas

Para investigar la respuesta inflamatoria luego de la inoculación experimental, se llevó a cabo la determinación del RCS mediante un contador Somacount 300 (Bentley), dentro de las 24 h de la recolección de las muestras de leche.

De la observación de los intervalos de confianza del 95% se puede afirmar que el RCS en leche de la GI presentó un incremento significativo a las 8 y 12 h con respecto al valor inicial. Asimismo la diferencia entre GI y GNI

también fue significativa en el mismo período de tiempo (Figura 23). Este resultado permite inferir sobre la estimulación de la respuesta inflamatoria en las glándulas inoculadas teniendo en cuenta que el umbral establecido en este estudio para RCS en cabras libres de inflamación fue igual o menor a  $10^6$  cél/ml.

Resultados similares están documentados en la literatura, Rambeaud *et al.* (2003) informaron el incremento en el RCS luego de 18 h pi alcanzando el pico máximo a las 120 h pi. Almeida *et al.* (2004) informaron un incremento significativo en el RCS entre las 12 a 24 h pi y se mantuvo por 72 a 96 h.

Aunque se observó un ligero incremento en el valor de la media del RCS durante las primeras 12 h pi en la GNI, con relación al obtenido al inicio del ensayo, éste no fue significativo (Figura 23).

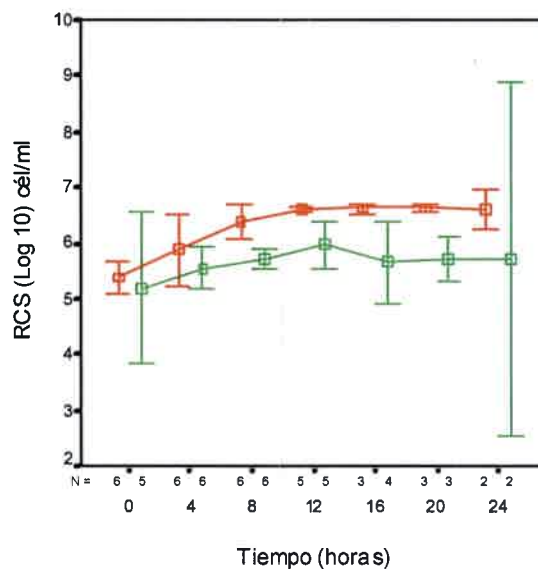


Figura 23. Recuento de células somáticas, expresado como Media  $\pm$  Error Standard, en leche de glándula inoculada (negro) y de glándula control (gris). (N= N° de cabras muestreadas)

Al inicio del ensayo, como a las 4 y 8 horas fueron muestreadas las GI y GNI de 6 cabras, a excepción de una GNI a la hora 0 por no contar con un volumen suficiente. A las 12, 14, 16 y 20 horas fueron muestreadas las GI y GNI de 5, 4, 3 y 2 cabras, respectivamente, a excepción de una GI a las 16 hs por no contar con un volumen suficiente.

### 6.7. Recuento de *S. uberis* en leche

Para conocer el comportamiento de la cepa luego de la infección experimental, se realizó el recuento de *S. uberis* a partir de las muestras de leche colectadas cada 4 h de cada glándula, por el método de dilución en placas de AS.

La cepa IR 47 obtenida en cultivo puro de cada muestreo fue confirmada como idéntica a la inoculada mediante su análisis fenotípico y genotípico.

En leche de GI se determinó un valor promedio máximo de  $3,3 \times 10^7$  UFC/ml a las 4 h pi, con recuentos de  $1,1 \times 10^6$  ufc/ml a las 8 h pi, y alcanzando valores en el orden de  $3 \times 10^4$  UFC/ml a partir de las 20 h pi. Las muestras de leche de GNI dieron cultivos invariablemente negativos a lo largo de toda la experiencia (Tabla 11).

Tabla 11: Recuento celular somático y Recuento bacteriano en leche de cabras inoculada con *S. uberis* IR 47

Cabras	Horas pi**	Glándula	RCS x 10 <sup>3</sup> (cel /ml )***	<i>S. uberis</i> x 10 <sup>3</sup> (UFC/ml)***
6	0	D	286	0
		I	462	0
6	4	D	1386	32938
		I	499	0
6	8	D	2839	1130
		I	530	0
5	12	D	4098	537
		I	1136	0
4	16	D	4234	149
		I	679,5	0
3	20	D	4275	33
		I	544	0
2	24	D	3885,5	39
		I	593	0

\* Número de cabras evaluadas; \*\* pi: post inoculación. \*\*\*: Los recuentos corresponden a la Media de los valores. D:Derecha; I:Izquierda

Si bien los resultados del recuento bacteriano en leche obtenidos en nuestro estudio mostraron una marcada disminución desde  $3,3 \times 10^7$  UFC/ml a las 4 h pi a aproximadamente  $3 \times 10^4$  UFC/ml a partir de las 20 h pi, se mantuvo un considerable número de bacterias en leche hasta el final del ensayo.

Los valores de recuento obtenidos luego de la inoculación de  $1 \times 10^8$  UFC/ml fueron superiores a los descriptos por Pedersen *et al.* (2003) en un ensayo de 12 h mediante la administración de un inóculo de  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Los autores informaron recuentos de bacterias en leche, del orden de  $4,7 \times 10^4$  UFC/ml a las 4 h pi y de  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml al final el ensayo.

Estos resultados difieren a los presentados por Smits *et al.* (1998), Rambeaud *et al.* (2003); Bannerman *et al.* (2005). En este sentido, Smits *et al.* (1998) informaron recuento de *S. uberis* en leche de  $10^7$  UFC/ml, luego de la inoculación de  $5 \times 10^2$  UFC/ml de la cepa 0140J al cabo de 60 h pi. En el estudio llevado a cabo por Bannerman *et al.* (2005) con  $2,2 \times 10^2$  UFC/ml de la misma cepa, se detectaron  $6,9 \times 10^7$  UFC/ml luego de 168 h del inicio de la infección. En la investigación realizada por Rambeaud *et al.* (2003) a partir de la administración de  $6,6 \times 10^3$  UFC/ml de la cepa UT 888 se informó un recuento bacteriano de  $1 \times 10^5$  UFC/ml a las 120 h pi.

Cabe destacar que la bibliografía citada refiere a estudios realizados en vacas. En el presente ensayo llevado a cabo en cabras, a las 24 h los valores de bacterias recuperadas en leche, fueron inferiores ( $10^4$  UFC/ml) a los informados por los diferentes autores, a pesar de la elevada densidad del inóculo inicial ( $10^7$  UFC/ml).

La marcada reducción en el número de bacterias, fue concomitante con el elevado RCS observado durante las 24 h del ensayo.

#### **6.8. Análisis de sangre. Recuento de glóbulos blancos y determinación de la fórmula leucocitaria**

Para conocer los cambios en el número total de glóbulos blancos y de los distintos tipos celulares durante la infección experimental, se determinó el

recuento de glóbulos blancos y la fórmula leucocitaria a partir de muestras de sangre periférica de cada cabra.

Los resultados muestran una disminución del número de leucocitos con relación al obtenido al inicio del ensayo (Figura 24).

La Tabla 12 presenta los valores de la media del recuento total de glóbulos blancos y de los distintos tipos celulares determinados en cada tiempo.

A pesar de la reducción en la media del número de neutrófilos segmentados a partir de de las 4 h pi hasta el final de la experiencia, los valores se encuentran dentro de los rangos normales en cabras. La disminución más notoria se observó a las 8 h y 24 h pi, y fue acompañada por la aparición de formas inmaduras como neutrófilos en banda y metamielocitos a las 4 y 8 h pi, respectivamente, detectados hasta el final del ensayo (Tabla 12) .

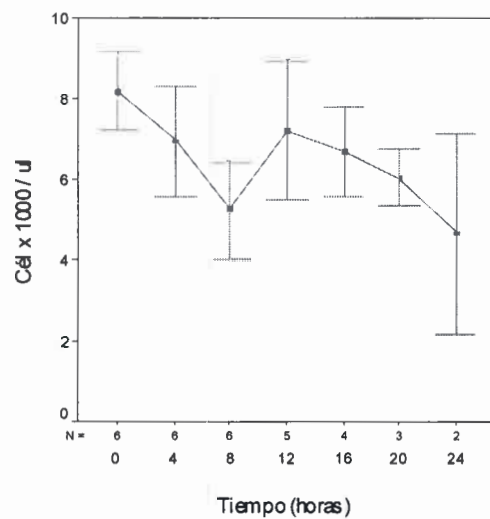


Figura 24. Recuento de Leucocitos (cél x 1000 / µl) en sangre, expresado como Media  $\pm$  Error Standard. N= Número de cabras muestreadas

Tabla 12. Recuento total y diferencial de glóbulos blancos (cél/ $\mu$ l) en sangre periférica

Horas pi*	Leucocitos	Metamielocitos	Neutrófilos banda	Neutrófilos segmentados	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos
0	8200,0			3735,6	3515,6	225,2	955,5
4	6966,6		418,5	3410,8	2067,1	177,2	373,5
8	5258,3	139,5	385,4	2616,6	1633,6	425,8	136,0
12	7230,0	132,0	379,0	3263,0	2576,4	699,8	476,0
16	6700,0	58,0	404,0	3053,2	2443,0	712,2	320,5
20	6016,6	61,0	465,0	3114,0	1851,0	430,0	205,5
24	4675,0	59,0	386,5	2463,5	1112,0	603,0	
VN	4000-13000			1200-7200	2000-9000		

pi: post inoculación, VN: Valor normal

### 6.9. Relación entre RCS en leche de la glándula inoculada y recuento de glóbulos blancos totales

Los resultados de esta investigación muestran un aumento en el RCS en leche a partir de las 4 h pi acompañado por una notoria disminución del número de leucocitos en sangre luego de las 8 h.

En coincidencia con lo descrito en nuestro estudio, Pedersen *et al.* (2003) observaron un incremento del RCS dentro de las 8 h pi con un descenso en el número de neutrófilos que se inició a las 5 h pi, y alcanzó un valor mínimo a las 9 h pi.

En investigaciones realizadas por Smits *et al.* (1998) y Bannerman *et al.* (2005) se informó una dinámica de migración similar, aunque el cambio se puso de manifiesto en un período mayor de tiempo. En el primer estudio se detectó el cambio a las 48 h pi, mientras que en el segundo se determinó alrededor de las 30 h pi y hasta la finalización del ensayo.

La Figura 25 muestra la relación entre la disminución de los glóbulos blancos totales de sangre periférica y el aumento concomitante del recuento de células somáticas en leche de las glándulas inoculadas.

Los resultados obtenidos sugieren la migración de los neutrófilos segmentados desde la circulación hacia los tejidos mamarios, para contribuir a la fagocitosis de las bacterias como primer evento en el marco de los mecanismos inespecíficos de defensa (Paape y Capuco, 2002).

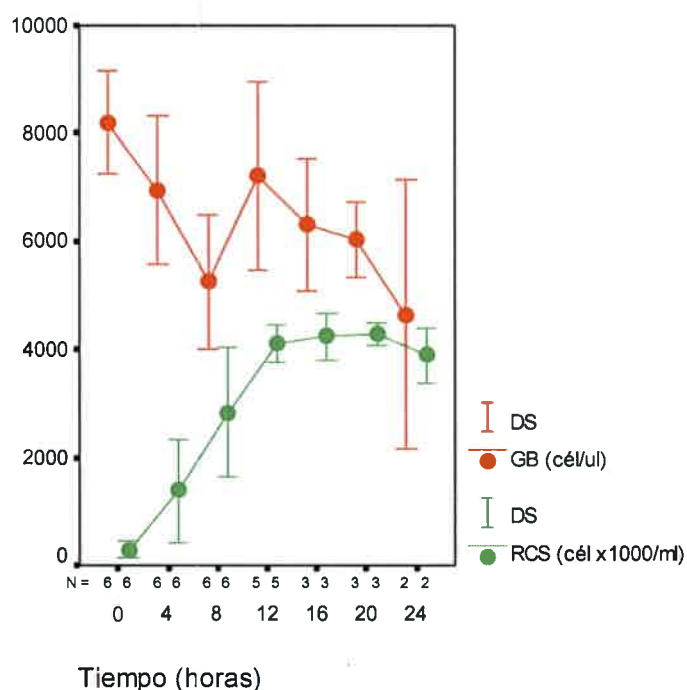


Figura 25. Recuento de glóbulos blancos totales (cél/ul) en sangre (gris) y recuento de células somáticas (cél x 10<sup>3</sup>/ml) (negro) en leche de glándulas inoculadas. Valores expresados como Media ± ES de las cabras evaluadas.

#### 6.10. Relación entre recuento bacteriano en muestras de leche y glóbulos blancos totales en sangre

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un elevado número de células de *S. uberis* detectadas en leche de la glándula inoculada a las 4 h pi (Tabla 11), y como consecuencia promueve la rápida migración de los neutrófilos segmentados desde la sangre hacia los tejidos de la glándula. Así, la reserva de neutrófilos maduros en médula ósea se agota, estimulando el proceso de leucocitosis. La entrada de formas inmaduras de leucocitos,

neutrófilos en banda y metamielocitos, a la circulación sanguínea fue detectada a las 4 h y 8 h pi, respectivamente. Este fenómeno provocó una ligera desviación hacia la izquierda de la fórmula leucocitaria (Tabla 12). Los valores de recuento de neutrófilos en banda y metamielocitos se mantuvieron hasta el final del ensayo, sugiriendo que la médula ósea no alcanza a satisfacer la demanda de neutrófilos maduros desde el sitio inflamatorio.

### 6.11. Examen bacteriológico de muestras de tejidos

A los efectos de investigar la capacidad de la cepa IR47 para colonizar e invadir diferentes tejidos se determinó el recuento de *S. uberis* por gramo de tejido de glándula mamaria derecha e izquierda, bazo, hígado y pulmón.

Tabla 13. Recuento bacteriano en leche y en órganos de cada cabra en el momento de la eutanasia

Cabra	Horas pi	GI		GNI		Bazo 10 <sup>1</sup> ufc/gr	Hígado 10 <sup>1</sup> ufc/gr	Pulmón 10 <sup>1</sup> ufc/gr
		Tejido 10 <sup>3</sup> ufc/gr	Leche 10 <sup>3</sup> ufc/ml	Tejido 10 <sup>3</sup> ufc/gr	Leche 10 <sup>3</sup> ufc/ml			
1	8	3,7	1300	NC	NC	NC	NC	NC
2	12	2,4	536	NC	NC	2,5	NC	8,0
3	16	0,56	VE	NC	NC	NC	NC	NC
4	20	0,21	24,8	NC	NC	NC	NC	NC
5	24	0,081	15	NC	NC	NC	NC	NC

Pi: post-inoculación; VE: Volumen Escaso; NC: No Crecimiento. GI : glándula inoculada; GNI: glándula no inoculada.

La cepa IR47 inoculada en la glándula derecha de cada animal fue aislada en cultivo puro por siembra de tejido mamario. Las cepas recuperadas fueron idénticas a la utilizada en la inoculación, puesto que fueron caracterizadas fenotípica y genotípicamente .

En este estudio la administración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml por vía intramamaria en la glándula derecha permitió la recuperación de  $1.3 \times 10^6$  UFC/ml en leche obtenida de esta glándula a las 8 h pi, coincidente con aparición de células



inmaduras e incremento en el RCS. La disminución de bacterias en leche de la glándula inoculada continuó hasta alcanzar  $1.5 \times 10^4$  UFC/ml a las 24 h (Tabla 13).

Además, el recuento de células de *S. uberis* determinado en el tejido de la glándula derecha de la cabra sacrificada a las 8 h pi fue de  $3.7 \times 10^3$  UFC/ml. Los valores encontrados fueron menores en los animales sacrificados durante el curso de la infección hasta alcanzar  $8.1 \times 10$  UFC/ml en la cabra sacrificada a las 24 h. En la glándula izquierda, los cultivos de tejido dieron resultados invariablemente negativos.

Por otro lado, una investigación realizada por Pedersen *et al* (2003) informó el desarrollo de una mastitis experimental en vacas, por administración de  $1 \times 10^7$  UFC/ml de la cepa UT103 de *S. uberis*. Los autores demostraron la recuperación de 2,3 a  $4,7 \times 10^4$  UFC/ml en leche de la glándula inoculada hasta las 10 h pi, con un descenso a  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml a las 12 h pi. Sin embargo, en las muestras de tejido mamario el recuento de células de *S. uberis* se mantuvo constante en el orden de  $10^3$  UFC/ml entre las 4 y 12 h pi.

En este estudio, cuatro de las cinco cabras sacrificadas, no se aisló *S. uberis* en órganos extramamarios. Sólo en la cabra 2, se detectó desarrollo de *S. uberis* en muestras de bazo y pulmón. De esta manera, la cepa IR47 mostró capacidad de internalizar el tejido epitelial mamario, sin llegar a colonizar otros tejidos. Los resultados observados en la cabra 2 se pueden adjudicar a factores propios del animal.

Estos resultados ponen en evidencia una respuesta efectiva del hospedador frente al patógeno.

## 6.12. Patología

Para investigar la patogénesis temprana inducida por *S. uberis* en cabras se llevó a cabo un estudio histológico. Las muestras investigadas fueron cisterna, región proximal, central y distal de ambas glándulas, como así también

ganglio linfático mamario derecho e izquierdo, de animales sacrificados cada 4 h a partir de las 8 pi.

Los resultados obtenidos en la glándula, nódulo y cisterna derecha de las cabras sacrificadas a los distintos tiempos son presentados a continuación. A las 8 h se detectaron 81 unidades secretoras (US) afectadas de un total de 63 lobulillos analizados. El porcentaje de US con cambios en la luz fue variable, evidenciado por la presencia de corpórea amilácea (CA) (2.7%-53.3%) y acumulación de neutrófilos (33% -100%) en las regiones central, distal y proximal (Figura 26, I)

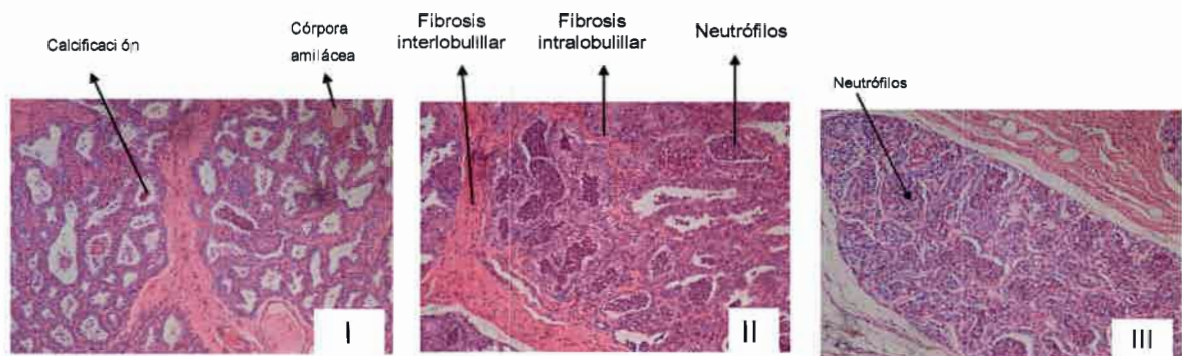


Figura 26. Glándula mamaria de cabra (región central) inoculada con *S. uberis*. HE x 20. I: 8 h pi. Acinos con escasos neutrófilos y unidades secretoras con calcificación y corpórea amilácea. II: 12 h pi. Numerosas unidades secretoras con neutrófilos e incipiente fibrosis intralobulillar e interlobulillar. III: 16 h pi. Presencia de un lobulillo con todas las unidades secretoras afectadas con acumulación de neutrófilos en su luz.

Un total de 717 US alteradas fueron detectadas de 57 lobulillos estudiados a las 12 h. Aproximadamente el 95% de las US presentaron acumulación de neutrófilos y calcificación, mientras que un reducido porcentaje mostraron CA (3.5%) y calcificación (Ca) (7%) (Figura 26, II).

Un progreso gradual de los cambios histológicos fue puesto de manifiesto por la detección de linfadenitis supurativa y neutrófilos en el nódulo linfático mamario y cisterna. Las lesiones identificadas fueron más severas a las 16 h, aunque se detectaron 558 US afectadas a partir del estudio de 70 lobulillos, mostrando una reducción en el número con relación al encontrado a las 12 h.

Las lesiones se caracterizaron por la obstrucción del 100% de la luz de los acinos como consecuencia de la acumulación de neutrófilos y la presencia de piocitos, además de infiltración mononuclear en el intersticio. Además, se determinó linfadenitis supurativa en el nódulo linfático mamario e infiltración de neutrófilos en la luz del tejido glandular subyacente en la cisterna (Figura 26, III).

A las 20 h se detectaron 62 US afectadas de 62 lobulillos analizados con alteraciones en su luz por la presencia de neutrófilos y piocitos. Así también, se identificó linfadenitis focalizada en el nódulo linfático mamario.

Finalmente, a las 24 h sólo se encontraron escasos neutrófilos en 98 US afectadas de 40 lobulillos analizados de las tres regiones de la glándula mamaria.

El estudio histológico de la GNI, utilizada como control en este ensayo, mostró en su porción central escasas unidades secretorias con alteraciones (Ca y CA) a las 8 y 12 h pi.

Los cambios histológicos informados coinciden en parte con los hallazgos descritos por Pedersen *et al.* (2003). Los autores informaron una acumulación de neutrófilos en el tejido conectivo intralobular, ductos de la leche y acinos secretorios. Los tejidos de animales infectados por 8 h ó más se caracterizaron por la presencia de edema, depósitos de fibrina en ductos de la leche y necrosis focal del epitelio en los ductos y alvéolos. El agrandamiento de los nódulos linfáticos mamario e inguinal profundo de la glándula inoculada fue asociado con edema, macrófagos y neutrófilos. En coincidencia con los resultados de nuestro estudio, los autores no identificaron lesiones en tejidos extramamarios.

En general, en la presente investigación se detectó un aumento progresivo de las lesiones en la GI desde las 8 h pi a las 16 h pi, mostrando una marcada reducción en el número de bacterias identificadas en leche entre las 8 h y 24 h. De esta manera, en esta investigación realizada en cabras se demostró el rol destacado de los neutrófilos en la fagocitosis de este patógeno.

En la investigación llevada a cabo por Pedersen *et al.* (2003) en bovinos también se destacó la importancia de los neutrófilos en la defensa inespecífica inicial frente a la invasión por *S. uberis*. En contraste con nuestro estudio, los

autores informaron el desarrollo de lesiones histológicas de manera lineal y ascendente a través de la glándula mamaria durante las 12 h del ensayo.

### 6.13. Inmunohistoquímica

Para investigar la patogénesis de *S. uberis* se procedió al inmunomarcado del microorganismo siguiendo la técnica peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). A partir del control positivo se observó un fuerte marcado de *S. uberis* sin coloración inespecífica de fondo, mientras que el control negativo no presentó marca.

En la porción distal de la GI se observaron a las 8 h pi bacterias libres en la luz de los acinos secretorios (Figura 27, I).

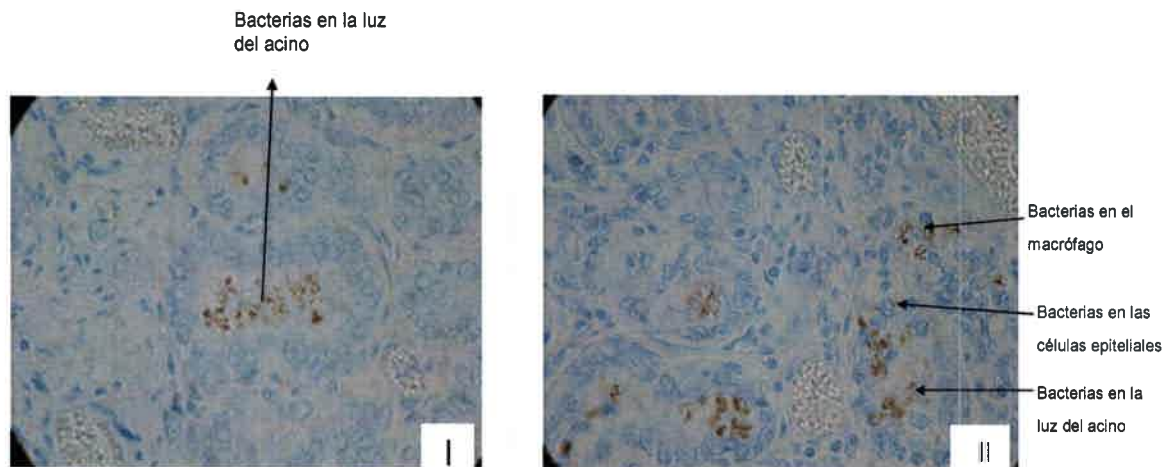


Figura 27. Glándula mamaria de cabra (región distal) inoculada con *S. uberis*. Método PAP. I: 8 h pi. X 40. II: 12 h pi. X 100.

A las 12 h, además de ser hallado en el lumen de los acinos secretorios, fue capaz de internalizar las células epiteliales y posteriormente fue detectado dentro de células inflamatorias en el tejido intersticial (Figura 27, II)

En una infección experimental realizada por Thomas *et al.* (1994) se identificaron las alteraciones patológicas resultantes de la inoculación intramamaria de *S. uberis* en 12 vacas, sacrificadas los días 1, 3 y 6 pi. Los resultados presentados por los autores muestran la presencia del microorganismo marcado con inmunoperoxidasa tanto en forma libre como fagocitado por el macrófago. Además, se encontró en la luz de los alvéolos,

adherido a células secretoras o ductos del epitelio, en el tejido subepitelial y septal como así también en vasos y nódulos linfáticos.

En la investigación realizada por Pedersen *et al.* (2003) en vacas, *S. uberis* fue localizado predominantemente dentro de macrófagos, pero también dentro de neutrófilos en la luz de los alvéolos inflamados. A las 8 h se observaron lesiones y la bacteria se distribuyó ampliamente por el tejido glandular sin invadir tejidos extramamarios.

## *Conclusiones y Perspectivas*

## VIII. CONCLUSIONES

Una marcada diversidad de perfiles bioquímicos fue identificada en las 54 cepas de *S. uberis*, aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica y subclínica provenientes de 17 establecimientos ubicados en las Provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires, e identificadas por pruebas convencionales.

El 81,1% (30/37) de las cepas de *S. uberis* de origen subclínico y el 76,5% (13/17) de las de origen clínico fueron confirmadas como pertenecientes a esta especie mediante la técnica de RFLP.

Diecisiete perfiles de virulencia fueron identificados en las 43 cepas de *S. uberis*. Del análisis de los perfiles de virulencia y el origen de las cepas se puede concluir que no existe asociación entre los perfiles de virulencia y el origen clínico o subclínico de la cepa.

Se identificaron 14 perfiles genéticos en las 32 cepas de *S. uberis* ensayadas mediante PFGE. Del análisis de los perfiles genotípicos, en general no se encontró relación entre los perfiles genotípicos y los perfiles de virulencia, origen clínico o subclínico ó tambo de procedencia.

De las 8 cepas de *S. uberis* seleccionadas para investigar la presencia de los genes asociados a la producción de factor activador del plasminógeno (FAP), se detectó el gen *pauA* en 1 de las 7 cepas de *S. uberis* con capacidad de expresar *in vitro* este factor.

Del análisis de los genes asociados a la producción de cápsula en las 8 cepas de *S. uberis* en estudio, se determinó la presencia del genotipo *hasABC+* en las dos cepas productoras de cápsula. Una cepa, con capacidad de inducir la producción de cápsula en medio suplementado, mostró el genotipo *hasABC+*.

El gen asociado a la producción de factor uberis no fue detectado en ninguna de las 8 cepas de *S. uberis* sin capacidad de producir *in vitro* este potencial factor de virulencia.

Del análisis de los ensayos de internalización de las 8 cepas de *S. uberis* a células epiteliales mamarias bovinas MAC-T, todas mostraron capacidad de internalización; sin embargo, las cepas IR23, IR46 e IR47 presentaron mayor capacidad de internalización.

Del estudio de la patogénesis temprana realizado en cabras se determinó que la cepa seleccionada fue capaz de inducir una mastitis subclínica, con un elevado RCS durante el período de estudio. La cepa inoculada fue detectada por inmunomarcado a las 12 h en la glándula mamaria, y las alteraciones histopatológicas cedieron a las 24h.

## IX. PERSPECTIVAS

En el marco de la Tesis Doctoral, la cepa *S. uberis* IR 47 inoculada por vía intramamaria fue capaz de inducir una mastitis subclínica en cabras durante una infección experimental de 24 h. Se propone realizar un ensayo con la misma cepa durante un tiempo más prolongado a los efectos de observar si se establece una mastitis clínica.

Por otra parte repetir la experiencia en cabras con una cepa negativa para todos los factores de virulencia analizados.

Realizar un estudio en vacas bajo idénticas condiciones al realizado en cabras. En el caso que la respuesta inflamatoria y cambios histopatológicos fueran similares a los obtenidos en el ganado caprino, se habría validado el uso de cabras como modelo animal para el estudio de mastitis subclínica provocada por *S. uberis*.







## *Bibliografía*

## X. BIBLIOGRAFÍA

**Aarestrup F., Weneger H., Rosdahl V. and Jensen N.** 1995. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 36:475.

**Aba L.** 2006. *Motivar*, Bs. As., 4(41):10-11, [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

**Almeida R. and Oliver S.** 1993. Growth curve, capsule expression and characterization of the capsular material of selected strains of *Streptococcus uberis*. *J. Vet. Med. B* 40:697-706.

**Almeida R., Matthews D., Luther D. and Oliver S..** 1994. Internalization of environmental streptococci by bovine mammary epithelium, pp. 398-399, in *Proc. 33<sup>rd</sup> Nat. Mast. Counc., Inc*, Arlington, VA, USA.

**Almeida R. and Oliver S.** 1995. Phagocytosis of *Streptococcus uberis* by bovine mammary macrophages. *J. Vet. Med. B* 42:331-337.

**Almeida R., Luther D., Kumar S., Calvino L., Bronze M. and Oliver S.** 1996. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. *J. Vet. Med. B* 43:385-392.

**Almeida R., Luther D. and Oliver S.** 1999a. Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 178,1: 81-85.

- Almeida R., Fang W. and Oliver S.** 1999b. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. FEMS Microbiol. Lett. 177: 313-317.
- Almeida R., Calvinho L. and Oliver S.** 2000. Influence of protein kinase inhibitors on *Streptococcus uberis* internalization into bovine mammary epithelial cells. Microbial. Pathog. 28: 9-16.
- Almeida R. and Oliver S.** 2001a. Interaction of coagulase negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. Microbial Pathog. Vol. 31, 5: 205-212.
- Almeida R. and Oliver S.** 2001b. Role of collagen in adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. J. Vet. Med. B Infect Dis. 48(10): 759-763.
- Almeida R., Gillespie B., Lewis M., Headrick J. and Oliver S.** 2004. Development of an experimental *Streptococcus uberis* intramammary infection model. Proc. Natl Mastitis Council.
- Almeida R., Luther D., Dake J. and Oliver S.** 2005. M-like Proteins of *Streptococcus uberis*. Proc. Natl Mastitis Council. 209-210.
- Almeida R. and Oliver S.** 2006. Trafficking of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. Microb. Pathog. 41 (2-3): 80-89.
- Anderson J.** 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. Br. Vet. J. 132: 229-245.

- Anderson J.** 1978. The problem of immunization against staphylococcal mastitis. *Br. Vet. J.* 134: 412-421.
- Ashbaugh C., Warren H., Carey V. and Wessels M.** 1998. Molecular analysis of the role of the Group A Streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule and M protein and a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J. Clin Invest.* Vol 102 (3):550-560.
- Azeredo L., Leite S., Freire D., Benchetrit L. and Coelho R.** 2001. Proteases from *Actinomyces* interfere in solid media plate assays of hyaluronidase activity. *J. Microbiol. Methods* 45: 207-212.
- Bacha W. and Bacha L.** 2001. Atlas Color de Histología Veterinaria. P: 81-109. 2° Edición. Ed. Inter-Médica
- Bannerman D., Pappe M., Goff J., Kimura K., Lipplis D. and Hope J.** 2005. The systematic and localized innate immune response to intramammary infection with streptococcus uberis. NMC Ann. Meet. Council.
- Barnad J. and Stinson M.** 1996. The Alpha-Hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect. Immun.*:3853-3857
- Baseggio N., Mansell P., Browning J. and Browning G.** 1997. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulse-field gel electrophoresis. *Mol. and Cell. Probes.* 11:349-354.
- Beck H., Wise W. and Dodd F.** 1992. Cost benefit analysis of bovine mastitis in the U.K.J. *J. Dairy Res.* 59:449.

- Benson J. and Ferrieri P.** 2001. Rapid Pulsed-Field Electrophoresis Method for Group B Streptococcus Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39(8). 3006-3008
- Bentley R. and Leigh J.** 1995. Development of PCR-based hybridization protocol for identification of Streptococcal species. *J. Clin. Microbiol.* 33(5):1296-1301.
- Booth J.** 1988. Incentives help reduce mastitis. Pag. 3-11 in Proc. 27<sup>th</sup> Nat. Mastitis Counc., Inc., Arlington, VA.
- Bramley J. and Dodd F.** 1984. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J. Dairy Res.*51:481-512
- Brouillette E., Grondin G., Shkreta L., Lacasse P., and Talbot B.** 2003a. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microbial Path.* 35: 159-168.
- Brouillette E., Talbot B. and Malouin F.** 2003b. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect. Immun.* 71 2292-2295.
- Brouillette G., Grondin G. and Lefebvre B.** 2004. Mouse mastitis model of infection for antimicrobial compound efficacy studies against intracellular and extracellular forms of *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol.* 101: 253-262.

- Brouillette E., Malouin F.** 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and Inf.* 7: 560-568.
- Buchanan R., and Gibbons N.** 1986. *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology*, 9<sup>th</sup> Ed. Vol.II, Williams and Wilkins C., Baltimore.
- Burns E., Marciel A. and Musser J.** 1996. Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect. Immun.* Vol 64, N° 11. 4744-4750.
- Calvinho L., Delgado A., Vitulich C., Occhi H., Canavesio V., Zurbriggen M. y Tarabla H.** 1991. Susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de organismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafecina. *Vet. Arg.* VIII: 676-680
- Carter G. and Cole J.** 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. Cap 17. *Streptococcus* and related cocci. 5<sup>th</sup> Edition. Academic Press.
- Casia dos Santos R. and Marin J.** 2005. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopath.* 159:251-3
- Chandler R.** 1970. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 3: 273-282.
- Chandler R., Smith K. and Turfrey B.** 1980. Studies on the phagocytic potential of secretory epithelial cells in experimental mastitis. *J. Comp. Path.* 90:385-394.

- Chatwal G.** 2002. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol.* 10:205-8.
- Christie R., Atkins N. and Munch-Petersen E.** 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 22:197-200.
- Coffey T., Pullinger G., Urwin R., Jolley K., Wilson S., Maiden M. and Leigh J.** 2006. First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 72 N° 2:1420-1428.
- Collins M., Farrow J., Katic V. and Kandler O.** 1984. Taxonomic studies on streptococci of serological group E, P, U and V: Description of *Streptococcus porcinus* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 5: 402-413.
- Contreras A., Corrales J. and Sanchez A.** 1997. Persistence fo subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *J. Dairy Sci.* 80:2815-819.
- Contreras A., Paape M. and Miller R.** 1999. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. *Small Ruminant Res.* 31: 203-208.
- Crater D. and van de Rijn** 1995. Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression in Group A *Streptococci*. *J. Biol. Chem.* 270: 18452-18458

- Delgado-Pertiñez M., Alcalde M., Guzmán- Guerrero J., Castel J., Mena and Caravaca F.** 2003. Effect of higiene-sanitary management on goat quality in semi-extensive systems in Spain. *Small Ruminant Res.* 47,51-61.
- Devrise L., Vandamme P., Collins M., Alvarez N., Pot B., Hommez J., Butaye P. and Haesebrouck F.** 1999. *Streptococcus pluranimalium* sp from cattle and others animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1221-1226.
- Dice L.** 1945. Measurements of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* 16: 297-302
- Diernhofer K.** 1932. Aesculinbouillon als Hilfsmittel für die Differenzierung von Euter und Milchstreptokokken bei Massenuntersuchungen. *Milchwirtschaftliche Forschungen.* 13: 368-378.
- Douglas V., Fenwick S., Pfeiffer D., Williamson N. and Holmes C.** 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulse-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 75:27-41.
- Duane P., Rubins J., Weisel H. and Janoff E.** 1993. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 61 (10): 4392-4397.
- Facklam R.** 1977. Physiological differentiation of viridans Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 5:184-201
- Facklam R.** 2002. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol 15( 4) : 613-630.



- Fang W. and Oliver S.** 1999. Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. FEMS Microbiol. Lett. 176:91-96.
- Fang W., Almeida R. and Oliver S.** 2000. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. Am. J. Vet. Res. 61, 275-279.
- Field T., Ward P., Pedersen L. and Leigh J.** 2003. The hyaluronic acid capsule of *Streptococcus uberis* is not required for the development of infection and clinical mastitis. Infect Immun. 71:1: 132-139.
- Finegold S. and Baron E.** 1989. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7<sup>th</sup> ed. pp. 116-117- 9<sup>o</sup> Edición. Editorial Panamericana. Mosby. St. Louis.
- Fontaine M., Perez Casal J., Song X., Shelford J., Willson P. and Potter A.** 2002. Immunization of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. Vaccine. 20:2278-2286.
- Fortin M., Messier S., Paré J. and Higgins R.** 2003. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, Gram-positive cocci isolated from milk samples. J. Clin. Microbiol.: 106-109
- Fournier J., Vann W. and Karakawa W.** 1984. Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* Type 8 capsular polysaccharide. Infect. Immun Vol 45, N° 1: 87-93.

- García-Lara J., Needham A. and Foster S.** 2005. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 43: 311–323
- Garvie E. and Bramley A.** 1979. *Streptococcus uberis*: An approach to its classification. *J. Appl. Bacteriol.* 46:295–304.
- Gase K., Ferretti J., Primeaux C. and McShan M.** 1999. Identification, cloning, and expression of the CAMP factor gene (*cfa*) of group A streptococci. *Infec. And Imm.* 67:4725-4731.
- Gilbert F., Luther D. and Oliver S.** 1997. Cultivation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix components and bovine mammary epithelial cells: induction of surface associated proteins. *FEMS Microbiol.*
- Gillespie B., Jayarao B. and Oliver S.** 1997. Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic deoxiribonucleic acid fingerprinting. *J. Dairy Sci.* 80:471-476.
- Gillespie B., Jayarao B., Pankey J. and Oliver S.** 1998. Subtyping of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions by DNA fingerprinting. *Zentralbl Veterinarmed B.*;45:585-93.
- Gillespie B. and Oliver S.** 2004. Comparison of an Automated Ribotyping Systems, Pulse-field Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting for differentiation of *Streptococcus uberis* strains. *Biotechnology.*3: 165-172.

- Giraudó J. y Busso J.** 1980. Etiología de mastitis bovina. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 61:43-47.
- Giraudó A., Calzolari A., Cataldi A., Bogni C. and Ángel R.** 1999. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. FEMS Microbiol. Lett. 177: 15-22 .
- Gonzalez R., Giraudó J. y Busso J.** 1980. Investigación en mastitis subclínicas: II agentes etiológicos bacterianos. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 61, 225-234.
- González O., Forchieri M., Nimo J. and Sirvén M.** 2002 Mamyzin award for excellence in the production of quality milk. 41<sup>st</sup> Ann. Meet. Natl. Council. Orlando, Florida.: 202-203.
- Gutman G., Guiguet E. and Rebolini J.** 2003. Los ciclos en el complejo lácteo argentino. SAGPyA 2003..
- Hardie J.** 1986. Other Streptococci. In Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol 2. Sneath, P.; Mair, M.; Shape E. and Holt G.. Baltimore 1068-1071
- Hassan A., Abdulmawjood A., Yildirim A., Kink K., Lammler C. and Schlenstedt R.** 2000. Identification of streptococci isolated from various sources by determination of *cfb* gene and other CAMP factor genes. Can J. Microbiol. 46: 946-951.
- Hynes W.** 1994 Methods in Enzimology. Vol 235. Cap 48: 606-616. Academic Press.

- Hynes W., Hancock L. and Ferretti J.** 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect. Immun.* 63(8): 3015-3020.
- Hynes W., Dixon A., Walton S. and Aridgides L.** 2000. The extracellular hyaluronidase (hyl A) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 184: 109-112.
- Hynes W. and Walton S.** 2001. Hyaluronidases of Gram positive bacteria. MiniReview . *FEMS Microbiol. Lett.* 183 : 201-207.
- Hogan J., Gonzalez R., Harmon R., Nickerson S., Oliver S., Pankey J and Smith K.** 1999: Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc. Madison, WI. 207.
- Hogan J. and Smith K.** 2003. Environmental Streptococcal Mastitis: facts, fables, and fallacies. *NMC Ann. Meet. Counc.*
- Jayarao B., Dore J., Baumbach G., Matthews K., and Oliver S.** 1991. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29(12): 2774-2778.
- Jayarao B., Doré J. and Oliver S.** 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. *J. Clin. Microbiol.* 30(9):235-2240.

- Jayarao B., Schilling E., and Oliver S.** 1993. Genomic Deoxiribonucleic acid Restriction fragment length polymorphism of *Streptococcus uberis*: evidence of clonal diversity. *J. Dairy Sci.* 76. 468-474
- Jayarao B. and Oliver S.** 1994. Polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species isolated from bovine milk. *J. Food Protection.* 57(3):240-245.
- Jiang M., Babiuk L. and Potter A.** 1996. Cloning sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microbiol Pathogenesis* 20: 297-307
- Johnsen L., Poulsen K., Kiliaan M. and Petersen T.** 1999. Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect. and Immun.* 1072-1078
- Jonsson P., Lindberg M., Haraldson I. and Wasdtrom T.** 1985. Virulence *S. aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as posible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. *Inf. Imm.* 49: 765-769.
- Jubb K., Kennedy P. and Palmer N.** 1990. Patología de los animales domésticos. Tomo 1. 3rd Edición. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L.
- Jurgens D., Sterzik B. and Fehrenbach F.** 1987. Unspecific bnding of group B streptpccico-cytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. *J. Exp. Med* 165: 720-732.

- Khan I., Hassan A., Abduimawjood A., Lammler C., Wolter W. and Zschock M.** 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J.Vet. Sci.* 4(3): 213-223.
- Lammler C.** 1991. Biochemical and serological properties of *Streptococcus uberis*. *Zentralbl Vetrinarmed B.* 38(10):737-742
- Leigh J.** 1994a. Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 118: 153-158.
- Leigh J.** 1994b. Progress in the understanding of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* for the lactating bovine mammary gland. 96-103 *Proc. Natl. Mast. Counc. Arlington, VA.*
- Leigh J.** 1999a. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *The Veterinary Journal.* 157:225-238.
- Leigh J., Finch J., Field T., Real N., Winer A., Walton A. and Hodgkinson S.** 1999. Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. *Vaccine.* 17:851-857.
- Leigh J.** 2000. Review. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480: 307-311.
- Lincoln R. and Leigh J.** 1988. Characterization of the interaction of bovine plasmin with *Streptococcus uberis*. *J. App. Microbiol.* 84: 1104-1110

- Lopes M., Merquior V., Peralta J. and Teixeira L.** 1995. Partial characterization of the co-hemolytic factor produced by *Streptococcus uberis* and comparison with CAMP-factor. FEMS Immunol. Med. Microbiol.12:205-212.
- McDonald T. and Mc Donald J.** 1976a. Streptococci isolated from bovine intramammary infections. Am. J. Vet. Res. 37 (4): 377-381.
- McDonald J., Mc Donald T. and Freeman B.** 1976b. Esculin hydrolysis by *Streptococcus dysgalactiae*. Am. J. Vet. Res. 37, 1115-1117.
- McDonald J.** 1979. Bovine mastitis: Introductory Remarks. J. Dairy Sci. 62:117-118.
- McDonald J. and Anderson A.** 1981. Experimental infection of bovine mammary glands with *Streptococcus uberis* during the nonlactating period. Am J. Vet. Res. 42(3): 465-467.
- McDonald J.** 1984. Streptococcal and Staphylococcal mastitis. Vet. Clinics of North America. 6(2): 269-285.
- McDonald W. and Deighton B.** 2005. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. Vet. Microbiol. 111: 241-246.
- McDougall S., Murdough P., Pankey W., Delaney C., Barlow J and Scruton D.** 2001 Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. Small Ruminat Res.40: 245-254.

- McDougal T., Parkinson T., Leyland M., Anniss F. and Fenwick S.** 2004. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows's milk. J. Dairy Sci. 87: 2062-2072.
- Matthews K., Jayarao B., Guidry A., Erbe E., Wergin W. and Oliver S.** 1994a. Encapsulation of *Streptococcus uberis* influence of storage and cultural conditions. Vet. Microbiol. 39:227-233.
- Matthews K., Almeida R. and Oliver S.** 1994b. Bovine mammary epithelial cell invasion of *Streptococcus uberis*. Infect. Immun. 62:5641-5646.
- Moroni P., Pisoni G., Ruffo G. and Boettcher P.** 2005. Preventive Veterinary Medicine [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- Moshynskyy I., Jiang M., Fontaine M., Perez-Casal J., Babiuk L. and Potter A.** 2003. Characterization of a bovine lactoferrin binding protein of *Streptococcus uberis*. Microb. Pathog.35: 203–215.
- National Mastitis Council**, 2003. Current concepts of bovine mastitis. p 11-14. 4<sup>th</sup> Ed.. Madison WI. USA
- National Mastitis Council**, 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality, 4<sup>th</sup> Ed. Nat. Mastitis Counc., W.D. Hoard and Sons Co., Fort Atkinson, WI.
- Odierno L., Risatti G., Calzolari A., González Quintana H. and Nagel R.** 1994. Pathogenicity in mice of *Staphylococcus aureus* mutants deficient in exoprotein síntesis. Vet Microbiol 41, 249-258



- Odierno L., Calvinho L., Traverssa M., Lasagno M., Bogni C. and Reinoso E.** 2006. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds.. J. Dairy Sci. 89: 3886-3890
- Olfert E., Cross B. and McWilliam A.** 1993. Guide to the care and use of experimental animals, Vol 1, 2<sup>nd</sup> Canadian Council on animal care. Ontario. Canada.
- Olive M. and Bean P.** 1999. Principles and applications of methods for DNA – based typing of microbial organisms. J.Clin. Microbiol. 37(6):1661-1669
- Oliver S., Almeida R. and Calvinho L.** 1998. Virulence factors of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. Zbl. Vet. B. 45(8):461-471.
- Oliver S., Luther D., Park H. and Almeida R.** 2004. SUAM: An important virulence factor in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. Proc. Natl Mastitis Counc.353-354
- Paape M. and Capuco A.** 2002. Celular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. J. Anim. Sci. 75:556-565.
- Patchara P., Mansell P., Dyson R., Hooper N., Dick J. and Browning G.** 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolated from dairy cows with mastitis. J. Clin. Microbiol. 39 (4): 1460-1466.

- Pedersen L., Aalbaek B., Rontved C., Ingvarstsen K., Sorensen N., Heegaard P. and Jensen H.** 2003. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. J.Comp. Path. Vol 128, 156-164
- Perez-Casal J., Prysliak T. and Potter A.** 2004. A GapC chimera retains the properties of the *Streptococcus uberis* wild-type GapC protein. Protein Expression and Purification Vol.33, Issue 2: 288-296
- Philpot W. and Nickerson S.** 1993. Mastitis: El contraataque. Surge International Babson Bros Ed., Ill., USA.
- Phuektes P., Mansell P., Dyson R., Hooper N., Dick J. and Browning G.** 2001. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. J. Clin. Microbiol.: 1460-1466
- Poutrel B. and Lerondelle C.** 1983. Cell content of goat milk; California mastitis test, Coulter counter and Fossomatic for predicting half infection. J. Dairy Sci.66:2575-2579.
- Poutrel B. and Ryniewicz H.** 1984. Evaluation of the API 20 Strep System for species identification of Streptococci isolated from bovine mastitis. J. of Clin. Microbiol. 19 (2): 213-214.
- Pullinger G., López-Benavides M., Coffey T., Williamson J., Cursons R., Summers E., Hulbert J., Maiden M. and Leigh J.** 2006. Application of *Streptococcus uberis* multilocus sequence typing analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom. App. Env. Microbiol.72 (2):1429-1436.

- Rambeaud M., Almeida R., Pighetti G. and Oliver S.** 2003. Dynamics of Leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet.Immun. and Immunopath* 96, 193-205.
- Ratafia M.** 1987. Worldwide opportunities in genetically engineered vaccines. *Biotechnology (New York)* 5:1154
- Reid I., Harrison R. and Anderson J.** 1976. Experimental staphylococcal mastitis in the mouse. A morphometric study of early changes in mammary gland structure. *J. Comp. Pathol.* 86, 329-336.
- Reinoso E., Dieser S., Calvinho L., Bogni C. and Odierno L.** 2008. *Streptococcal, Enterococcal and Aerococcal* Species Isolated from Bovine Milk in Argentinean Dairy Herds. Enviado a *Vet. Microbiol.* para su revisión. Reference Number: VETMIC-D-08-3018.
- Reneau J. and Packard V.** 1991. Monitoring mastitis, milk quality, and economics losses in dairy fields. *Dairy Food Environ. Sanit.* 11:4.
- Rivero V., Vena M. y Corbellini C.** 1984. Resultados bacteriológicos en casos de mastitis clínicas en rodeos lecheros de la cuenca de abasto del Gran Buenos Aires. I Congreso Nacional de Mastitis Bovina, Firmat, Santa Fe.
- Roguinsky M.** 1972. Comparaison de *Streptococcus uberis* et de Streptocoques voisins. *Ouest Med.* 25: 983-985.
- Rosey E., Lincoln R., Ward P., Yancey R. and Leigh J.** 1999. Pau A: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178:27-33.

- Sánchez A., Contreras A. and Corrales J.** 1999. Parity as a risk factor for caprine subclinical intramammary infection. *Small Ruminant Res.* 31, 197-201.
- Sanger Institute.** Proyecto genoma *Streptococcus uberis*. Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK. [http://www.sanger.ac.uk/projects/s\\_uberis/](http://www.sanger.ac.uk/projects/s_uberis/).
- Schaufuss P., Sting R., Schaeg W. and Blobel H.** 1989. Isolation and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus uberis*. *Zent. B.. Bakt. Hyg. A.* 171, 46-53.
- Schleifer K. and Kilpper-Bälz R.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:31-34.
- Schleifer K.** 1985. Analysis of the chemical composition and primary structure of murein. In: G. Gottschalk (ed.). *Meth. in Microbiol.* Vol. 18. Academic Press, Inc., London. UK.
- Schleifer K. and Kilpper-Bälz R.** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A Review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 1-19.
- Sears P., González R., Wilson D. and Han H.** 1993. Procedures for mastitis diagnosis and control. *Vet.Clin. North America: Food Animal Practice.* 9 (3). 445-468.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA).** 2007. Indicadores mensuales de la producción Argentina de leche. [www.alimentosargentinos.gob.ar/lacteos](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/lacteos)
- Skalka B. and Smola J.** 1981. Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor-a new finding about diffusible exosubstance of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Zentralbl Bakteriol A.* 249(2):190-194
- Smits E., Burvenich C., Guidry A. and Roets E.** 1998. In vitro expression of adhesion receptors and diapedesis by polymorphonuclear during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Infect and Immun.* Vol 66. Nº 6, 2529-2534.
- Simon R., Scoggin C. and Patterson D.** 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* Vol 256, 14, 7181-7186.
- Sneath P and Sorkal R.** 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco. W. H. Freeman.
- Sutra L. and Poutrel B.** 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89.
- Tamilselvam B. and Almeida R.** 2006. *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathog.* 40(6):279-285.
- Tenover F., Arbeit R., Goering R., Miclesen P., Murray B., Persing D. and Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns

produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. J. Clin. Microbiol. 33( 9) : 2233-2239.

**Tenovuo J. and Larjava H.** 1984. The protective effect of peroxidase and thiocyanate against hydrogen peroxide toxicity assessed by the uptake of (3H)-thymidine by human gingival fibroblasts cultured in vitro. Arch Oral Biol. 29 (6): 445-451.

**Tessi M., Alvarez de Esponda R., Sabattini de Comini L., Giovedone de Taher, Paura A., Moguilevsky M., Casado N., Romano L and Weidman P.**1979. Etiología microbiana de mastitis bovina subclínica en la Cuenca lechera santafesina. Rev. Arg. Microbiol. 11(2): 49-56.

**Thomas L., Haider W., Hill A. and Cook R.** 1994. Pathologic findings of experimentally induced *Streptococcus uberis* infection in the mammary glands of cows. Am. J. Vet. Res. 55:1723-1728.

**Ward P., Field T., Ditchman W., Maguin E. and Leigh J.** 2001. Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes *hasA* , *hasB* and *hasC* in *Streptococcus uberis*. Infect Immun. 392-399.

**Ward P. and Leigh J.** 2002. Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. J. Bacteriol. 119-115

**Ward P., Field T., Rapier C and Leigh. J.** 2003. The activation of bovine plasminogen by PauA is not required for virulence of *S. uberis*. Infect. and Immun. 71(12):7193-7196.

- Watts J.** 1988. Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 71:1616-1624.
- Watts J.** 1989. Evaluation of the Rapid Strep System for identification of Gram-positive, catalase-negative cocci isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 72: 2728-2732.
- White E. and Hinckey L.** 1999. Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Ruminant Res.* 33, 117-121.
- Williams A. and Collins M.** 1990. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp.nov. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 485-490.
- Zadoks R. and Schukken Y.** 2003. *Streptococcus uberis*: environmental or contagious pathogen?. *Proc. Natl Mastitis Counc.* 61-67.
- Zadoks R., Schukken Y. and Wiedmann M.** 2005. Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene *pauA*. *J Clin Microb.* Vol 43, N° 5: 2407-2417



## *Apéndice*



## XI. APÉNDICE

### 1. Medios de Cultivos.

#### 1.1. Medios de Cultivo Comerciales

Caldo Tripticasa Soja (CTS, Britania)

Caldo Todd- Hewitt (TH, Difco)

Caldo Cerebro Corazón (CCC, Biokar Diagnostics)

#### 1.2. Medios de cultivo elaborados en el laboratorio a partir de sus componentes

Caldo para el crecimiento de estreptococos (CCE) (g/l): Caldo Tripticasa Soya 30, Extracto de levadura 7,5, Sacarosa 5, Fosfato dipotásico 5. pH 7,4

Agar para el crecimiento de estreptococos (ACE) (g/l): Caldo Crecimiento de estreptococos suplementado con agar 15. pH 7,4

Agar Sangre (AS) (g/l): Caldo Tripticasa Soya 30, sangre ovina al 5%

Caldo Arginina (g/l): Triptona 5, Fosfato ácido de potasio 2, Glucosa 0,5, Extracto de levadura 5, Monoclorhidrato de L-arginina al 0,5%. pH 7,0

Caldo Hipurato de sodio.(g/l): Hipurato de sodio 50, Agua destilada

Caldo Esculina. (g/l): Peptona 10, NaCl 5, Agar 12, Esculina 1, Citrato férrico 0,5. pH 7,4

Caldo NaCl 6,5%.(g/l): Caldo Cerebro Corazón 37, NaCl 60, Púrpura de bromocresol 16, Glucosa 10. pH 7,0

Caldo Básico Rojo de Fenol (g/l): Peptona 10, Extracto de carne 1, NaCl 5, Rojo de Fenol 0,018. pH 7,4. Azúcares (Inulina, Manitol, Salicina, Sorbitol, Rafinosa) al 1%

Medio para Factor Activador de Plasminógeno: agarosa 1% en PBS, leche al 2%

Medio para actividad hialuronidasa: 400 ug/ml de ácido hialurónico (humor vítreo bovino; Sigma), albúmina sérica bovina fracción V 1%, agarosa 2 %, buffer 50mM de  $\text{NaPO}_4\text{H}_2 / \text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$  pH 7,2

Medio para actividad proteasa: Caldo Todd Hewitt, agarosa al 0,8%; leche descremada (Difco) al 3% P/V

Medio de Crecimiento Celular (MCC): Medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM); suero fetal bovino 10%, L-glutamina 2 mM; insulina bovina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; hidrocortisona 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . pH 7-7,5

## 2. Material biológico

Sangre Ovina desfibrinada

## 3. Soluciones y reactivos

Reactivo de Nessler:

Solución A: 5g de IK en 5 ml de agua destilada

Solución B: 2g de  $\text{HgCl}_2$  en 35 ml de agua destilada

Solución C: 20 ml de NaOH 5 N. Agua destilada csp 100 ml

Reactivo de Hipurato. Ninhidrina 3,5, 1-Butanol 50 ml, Acetona 50 ml

Reactivo de catalasa. Peróxido de Hidrógeno 30%

Solución Stock de EDTA 0,5M. pH 7,5 y 7,8: (g/l): EDTA dihidratado 232,6, pellets de NaOH, agua destilada. Ajustar pH con pellets de NaOH

Solución Stock de Tris 1M. pH 7,5 y 7,8: Tris base 12,11%, HCl 6% para pH 7,5 ó HCl 4,2% para pH 7,8, agua destilada

NaCl 5 M

Fenol equilibrado con Tris 0,1 M. pH 8

Cloroformo: Alcohol Isoamílico (49:1 vol/vol)

NaAc 1 M

Etanol 100%  
 Solución fisiológica (SF): NaCl 0,9%  
 Albúmina Sérica Bovina 100x: 10 mg/ml (Promega)  
 Desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): 100 mM (Promega)  
 MgCl<sub>2</sub>: 25 mM (Promega)  
 Agua tridestilada libre de nucleasas  
 Plasminógeno bovino (cedido por el Dr Leigh)  
 Acido hialurónico (humor vítreo bovino; Sigma)  
 Albúmina sérica bovina fracción V 1%  
 Agarosa Low Melting Point 1,5% (LMP)  
 Agarosa EEO (Sigma) 1%  
 Bromuro de Etidio 10 mg/ml,  
 Gentamicina 100 µg/ml  
 Tritón X100: 0,025%

#### 4. Buffers

Buffer PBS(g/l): NaCl 8, KCl 2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44; PO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub> 0,24, pH 7,4  
 Buffer TE<sup>1</sup>: Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 7,6  
 Buffer TE<sup>2</sup>: Tris 10mM; EDTA 1 mM, pH 7,6  
 Buffer TE<sup>3</sup>: Tris 10 mM ; EDTA 5 mM; pH 7,8  
 SDS/Tris/EDTA: SDS 20% (p/v), Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 7,8  
 Buffer ES: 0,5M EDTA pH 9, 1% n-lauroyl sarcosine  
 Buffer Taq 10x (Promega)  
 Buffer B (Promega)  
 Buffer C (Promega)  
 Buffer J (Promega)  
 Buffer TAE 50x: (g/l): Tris base 242, Ácido Glacial Acético 57,1 ml, 100 ml EDTA 0,5 M, pH 8  
 Buffer TBE 5x (g/l): Tris 54, Ácido Bórico 27,5, EDTA 20 ml 0,5 M, pH 8  
 Buffer muestra 6x (Promega)  
 Buffer muestra 10x: Glicerol 50 %, Azul de bromofenol 0,025%, TBE 5x.

## 5. Enzimas

Lisozima 50 mg/ml

Proteinasa K 20 mg/ml

Lisostafina 0,2 µg/ml

RNAasa 10 mg/ml

Hialuronidasa testicular bovina 122 U/ml

Papaína 1 mg/ml (15 U /ml)

Tripsina 0,25%

Taq DNA Polimerasa 5 U/µl (Promega)

### 5.1. Endonucleasas de Restricción

HhaI 10 U/µl (Promega)

RsaI 10 U/µl (Promega)

MspI 10 U/µl (Promega)

SmaI 10 U/µl (Promega)

U.N.R.C.  
Biblioteca Central



66129

66129