

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología
Orientación Genética Microbiana



Obtención y caracterización de mutantes de *Streptococcus uberis* deficientes en los genes *pauA* y *sua*

TRABAJO FINAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE MICROBIÓLOGA

Balmaceda Rocío Soledad

Directora: Dra. Elina Reinoso

Co-Directora: Dra. Liliana Odierno

Córdoba, 2013

Alumna: Balmaceda Rocio Soledad

.....

Directora: Dra. Elina Reinoso

.....

Co-Directora: Dra. Liliana Odierno

.....

Tribunal evaluador:

Dra. Claudia Raspanti

.....

Dr. Germán Barros

.....

Dra. Elina Reinoso

.....

A mi mamá Beatriz y mi hermano Miguel, por su apoyo incondicional...

A mi papá y hermanas; Ivana, Cecilia y Paola.

A Dios... por darme la oportunidad de lograr una meta tan importante en mi vida. A Hilda, esa persona tan especial que él puso en mi camino.

A mis "amigas de lejos"; Yani, Eri y Flor, porque a pesar de la distancia estuvieron conmigo todos estos años.

A mis amigas y compañeras de carrera; María, Mariana y Laura, porque me aceptaron tal cual soy y recorrieron conmigo todos estos años de carrera, brindándome su apoyo y amistad!

Por último, a Elina, mi directora, por su paciencia, apoyo y dedicación.

Índice

Resumen	IV
Abreviaturas.....	V
Introducción	1
1.1. Mastitis Bovina	1
1.2. Agentes causales de mastitis.....	1
1.3. <i>Streptococcus uberis</i> y factores de virulencia	2
1.4. Vacunas contra la mastitis producida por <i>S. uberis</i>	4
1.5. Sistemas para la obtención de mutantes <i>S. uberis</i>	6
Hipótesis y Objetivos.....	9
Materiales y Métodos.....	11
1. Cepas bacterianas y plásmidos.....	12
2. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas	14
3. Soluciones y medios de cultivo.....	15
3.1. Medios de cultivo.....	15
3.2. Antibióticos.....	15
3.3. Soluciones Minipreps para extracción de ADN plasmídico.....	16
3.4. Extracción y amplificación de ADN	16
3.5. Recuperación de ADN de geles de agarosa.....	17
3.6. Determinación de actividad PauA	17
4. Obtención de mutantes <i>pauA / sua</i> de <i>S. uberis</i>	18
4.1. Clonado de los genes <i>pauA / sua</i> en el vector de clonado pGEM®-T Easy.....	18
4.1.1. Extracción de ADN cromosomal	18
4.1.2. Amplificación de los genes <i>pauA / sua</i> mediante PCR.....	19
4.1.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	19
4.1.4. Ligación de los productos amplificados en el vector pGEM®-T Easy.....	19
4.1.5. Obtención de células <i>E. coli</i> DH5α electrocompetentes.....	21
4.1.6. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5α.....	21
4.1.7. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina.....	22
4.2. Subclonado de los genes <i>pauA / sua</i> en el vector pORI280.....	23
4.2.1. Liberación y purificación del inserto	23
4.2.2. Aislamiento y digestión enzimática del plásmido pORI280	23
4.2.3. Ligación de los insertos purificados en el plásmido ORI280	24
4.2.4. Preparación de células competentes <i>E. coli</i> EC1000.....	24
4.2.5. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> EC1000	24

4.2.6. Selección de transformantes pORI: <i>sua</i> / pORI: <i>pauA</i>	25
4.3. Transformación en cepas de <i>S. uberis</i> con pORI: <i>sua</i> / pORI: <i>pauA</i>	26
4.3.1. Preparación de células competentes de <i>S. uberis</i>	26
4.3.2. Transformación de <i>S.uberis</i> con el vector pG ⁺ host3	26
4.3.3. Ensayo de estabilidad del plásmido pG ⁺ host3	27
4.3.4. Obtención de mutantes de <i>S.uberis</i>	27
5. Caracterización de las mutantes obtenidas de <i>S. uberis</i>	28
5.1. Extracción de ADN cromosomal	28
5.2. PCR para la detección del gen <i>sua</i>	29
5.3. Secuenciamiento de los productos <i>sua</i> amplificados	29
5.4. PCR para la detección del gen <i>pauA</i>	29
5.5. Determinación de Factor activador del plasminógeno en mutantes PauA	29
Resultados y Discusión	30
1. Obtención de mutantes <i>pauA</i> / <i>sua</i> de <i>S. uberis</i>	31
1.1. Clonado de los genes <i>pauA</i> / <i>sua</i> en el vector de clonado pGEM®-T Easy.....	31
1.1.1. Amplificación de los genes <i>pauA</i> / <i>sua</i> mediante PCR.....	33
1.1.2. Ligación de los productos amplificados en el vector pGEM®-T Easy.....	33
1.1.3. Transformación y selección de colonias con plásmido recombinante	34
1.2. Subclonado de los genes <i>pauA</i> / <i>sua</i> en el vector pORI280	35
1.2.1. Liberación y purificación del inserto	35
1.2.2. Aislamiento y digestión enzimática del plásmido pORI280	37
1.2.3. Transformación y selección de transformantes	37
1.3. Transformación en <i>S. uberis</i> con pORI: <i>sua</i> / pORI: <i>pauA</i>	39
1.3.1. Ensayo de estabilidad del plásmido pG ⁺ host3.....	39
1.3.2. Transformación de <i>S. uberis</i> con el plásmido pORI: <i>sua</i> / pORI: <i>pauA</i>	40
2. Caracterización de mutantes <i>pauA</i> / <i>sua</i> de <i>S. uberis</i>	41
2.1. PCR para la detección del gen <i>sua</i>	41
2.2. Secuenciamiento de los productos <i>sua</i> amplificados	42
2.3. PCR para le detección del gen <i>pauA</i>	43
2.4. Determinación de Factor activador de plasminógeno en mutantes PauA	44
Perspectivas	46
Conclusión	47
Bibliografía	49

Índice de figuras

Figura 1. Mapa correspondiente al vector de clonado pGEM®-T Easy.....	13
Figura 2. Mapa correspondiente al vector pORI280.....	13
Figura 3. Mapa correspondiente al vector pG ⁺ host3.....	14
Figura 4. Representación esquemática de la integración del vector pORI280.....	32
Figura 5. Productos amplificados de los genes <i>pauA</i> y <i>sua</i>	33
Figura 6. Extracción de ADN plasmídico de colonias blancas <i>sua</i> y <i>pauA</i>	35
Figura 7. Corte con <i>EcoRI</i> del plásmido recombinante pGEM: <i>sua</i>	36
Figura 8. Corte con <i>EcoRI</i> del plásmido recombinante pGEM: <i>pauA</i>	36
Figura 9. Análisis del amplicón del gen <i>pauA</i> con el software NEBCutter	37
Figura 10. Extracción del plásmido pORI280	37
Figura 11. Reacción de PCR para detectar el plásmido pORI: <i>sua</i>	39
Figura 12. Detección del gen <i>sua</i> en mutantes <i>S. uberis</i>	42
Figura 13. Fenograma de la secuencia amplificada del gen <i>sua</i>	43
Figura 14. Detección del gen <i>pauA</i> en mutantes de <i>S. uberis</i>	44
Figura 15. Determinación de Factor activador de plasminógeno en mutantes <i>pauA</i>	44

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos	12
Tabla 2. <i>Primers</i> y programas empleados	19
Tabla 3. Componentes del sistema de clonado pGEM®-T Easy	20
Tabla 4. Reacciones de ligación.....	20
Tabla 5. Digestión enzimática	23
Tabla 6. Reacciones de ligación A y B.....	24
Tabla 7. Ensayo de estabilidad del pG ⁺ host3 en la cepa SU73	40
Tabla 8. Ensayo de estabilidad del pG ⁺ host3 en la cepa SU106	40

Resumen

La mastitis bovina continúa siendo la enfermedad más frecuente y costosa para la explotación lechera pese a que se han realizado considerables progresos en el control de dicha enfermedad. Se estima que el 90% de los casos de mastitis infecciosas encontradas frecuentemente en tambos son causadas por bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Los estreptococos ambientales son frecuentemente aislados tanto de mastitis clínicas como subclínicas, considerándose a *Streptococcus uberis* como el principal patógeno ambiental. Si bien la patogénesis de la mastitis producida por *S. uberis* aún no es bien comprendida, se han descrito potenciales factores de virulencia entre ellos PauA y SUAM, asociados a la activación del factor activador del plasminógeno y a la capacidad de adherencia e internalización a la células epiteliales mamarias bovinas. La ineficacia de las medidas de control tradicionales para reducir la tasa de nuevas infecciones ha dirigido la investigación hacia la búsqueda de métodos de control alternativos basados en el desarrollo de vacunas para complementar las medidas de control existentes. La mayoría de los hallazgos informados demuestran que tanto las proteínas PauA como SUAM podrían ser empleadas como antígenos para el posible desarrollo de una subunidad vacunal. El objetivo del presente trabajo estuvo dirigido a la obtención de mutantes de *S. uberis* deficientes en los genes *pauA* y *sua* mediante mutagénesis sitio-dirigida y la posterior caracterización de dichas mutantes. Para la obtención de las mutantes se empleó el uso combinado de dos tipos de vectores con replicación condicional, derivados del plásmido pWV01: los vectores pORI280 y pG⁺host3. Para ello, fragmentos amplificados de los genes *pauA* y *sua* fueron clonados en el plásmido pORI280 y recuperados en la cepa *E. coli* EC1000 RepA⁺. Posteriormente los plásmidos recombinantes se emplearon para transformar la cepa *S. uberis* seleccionada.

Finalmente, la metodología empleada en este trabajo permitió obtener cepas mutantes de *S. uberis*. Dichas cepas fueron caracterizadas preliminarmente a nivel genotípico y fenotípico. Cabe destacar que en la bibliografía nacional e internacional no se han descrito estrategias para la obtención de mutantes en *S. uberis* como la que ha sido desarrollada en este trabajo.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampiclina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina Sérica Bovina
°C	Grado Celsius
Cm	Cloramfenicol
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
Em	Eritromicina
g	gramo
h	Hora
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltons

kV	Kilovoltios
l	Litro
LB	Medio Luria Bertani
mA	Miliamperes
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
msec	milisegundos
N	Normal
ng	Nanogramo
N°	Número
pb	Pares de base

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis de campos pulsantes
pH	Potencial hidrógeno
r :	Resistente
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundo
STE	Buffer Tris-cloruro de sodio-EDTA
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
TH	Medio Todd-Hewitt
Tris	N- tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta

V/V	Relación volumen en volumen
Xgal	5-bromo-4 cloro-3 indolil- β -galactopiranosido
%	Porcentaje
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar
Ω	Ohms

Introducción

1.1 MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina es la inflamación de la glándula mamaria, generalmente causada por agentes bacterianos. A nivel mundial, es considerada como la enfermedad del ganado vacuno que mayores pérdidas económicas causa al productor y a la industria lechera, ya que provoca disminución de la secreción láctea y deterioro de la calidad de la leche (Booth, 1981; Reneau y Packard, 1991). Se estima que debido a la menor producción de leche, los mayores costos por separación de animales, el importe en antibióticos, la leche descartada debido a tratamiento con antibióticos, los costos por servicios veterinarios y el trabajo extra, la capacidad productiva anual disminuye del 10 al 11% (De Graves y Fetrow, 1993; Bramley y col., 1996). Durante las últimas décadas se han producido grandes transformaciones en el sector lechero en Argentina. A partir de la década del 90 se observó un significativo aumento de la producción y la productividad y posteriormente los esfuerzos se centralizaron en mejorar la calidad higiénica y sanitaria a través de un mayor control de la mastitis (Calvinho y Tirante, 2005). En Argentina, como consecuencia de esta enfermedad, se estiman pérdidas valuadas en U\$221 millones anuales (Paulón, 2012). El mejoramiento de la calidad de la leche y los derivados lácteos que se producen en el país es prioritario teniendo en cuenta un potencial aumento de la capacidad exportadora del sector, principalmente en el marco del Mercosur. Adicionalmente, son cada vez mayores las presiones del consumidor interno para el mejoramiento de la calidad de los productos.

1.2 AGENTES CAUSALES DE MASTITIS

Se han identificado más de 80 agentes causales de mastitis, incluyendo especies de bacterias, hongos y algas (Watts, 1988). Sin embargo la mayoría de las infecciones son causadas por bacterias, estos organismos causantes de mastitis han sido clasificados en patógenos contagiosos y ambientales de acuerdo con sus características de distribución e interacción con el pezón y su canal. Los patógenos contagiosos viven y se multiplican en la glándula mamaria y la piel del pezón, se transmiten de animal a animal principalmente durante el ordeño e incluyen a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y especies de *Mycoplasma*. Los patógenos ambientales son aquellos cuyo reservorio primario es el medio ambiente que rodea a los animales. Estos organismos constituyen un grupo heterogéneo, siendo los más frecuentemente aislados los estreptococos y las bacterias coliformes mientras que *Streptococcus disgalactiae* puede comportarse tanto como un patógeno ambiental como contagioso. Un tercer grupo lo constituyen los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN), que si bien son considerados como integrantes de la flora normal de piel de la ubre y los pezones, también pueden causar infecciones del canal del pezón y la

glándula mamaria. La distribución dentro de los rodeos lecheros de las distintas especies que conforman este grupo reflejan, en parte, las prácticas de manejo aplicadas en cada establecimiento (Calvinho, 2010). La condición multietiológica de esta enfermedad y la ubicuidad de algunos microorganismos en el ambiente hacen imposible la erradicación de la enfermedad, no obstante se cuenta con diversas técnicas que, utilizadas en forma conjunta podrían asegurar su control. Los programas actuales empleados en el control de mastitis bovina fueron desarrollados en la década del 60 y están basados en higiene durante el ordeño, incluyendo desinfección de pezones post ordeño, terapia antibiótica en lactancia y al inicio del período seco, y descarte de vacas con infección crónica. La aplicación de éstas medidas ha conducido a un progreso considerable en el control de los patógenos contagiosos. Sin embargo, la desinfección de pezones post ordeño y la terapia de vaca seca se han mostrado menos efectivos contra los patógenos ambientales (Calvinho, 2010). Varios estudios han demostrado que en la medida en que se logró reducir la prevalencia de patógenos contagiosos, la proporción de infección intramamaria (IIM) por patógenos ambientales se incrementó (Calvinho, 2007). Por lo cual, no es sorprendente que las mastitis de tipo ambiental se conviertan en un problema significativo en aquellos establecimientos que a través de un buen manejo sanitario lograron un control de la mastitis causadas por organismos contagiosos.

1.3 STREPTOCOCCUS UBERIS Y FACTORES DE VIRULENCIA

Streptococcus uberis es reconocido como el más importante patógeno ambiental causante de mastitis clínica y subclínica en vacas lactantes y no lactantes (Luther y col., 2008). Es el estreptococo más frecuentemente aislado y causa entre el 14% y 26% de los casos de Canadá, EEUU, Holanda o Reino Unido. Representa el 80% de los estreptococos no *agalactiae*. Este microorganismo aparece a menudo en inicio de lactación siendo en el 23% de los casos aislado en el parto o en las dos primeras semanas postparto. Pueden permanecer como subclínicos y a pesar de ello producir grandes pérdidas en la producción. Los casos crónicos pueden persistir con altos recuentos celulares durante meses (Calvinho, 2007).

Pese a que la patogénesis de la mastitis a *S. uberis* aún no es bien comprendida, se han descrito potenciales factores de virulencia. Entre ellos se reconocen la cápsula, proteínas M-like y R-like, toxina neutrofílica, hialuronidasa y proteínas de unión a componentes de la matriz extracelular (Almeida y col., 1996). La producción *in vitro* de factores de virulencia se encuentra regulado por señales del medio ambiente (Leigh y col., 2004). Por lo tanto, resulta relevante el estudio de los genes responsables de la síntesis de los potenciales factores de virulencia.

La capacidad de *S. uberis* para infectar la glándula mamaria es dependiente de su capacidad para crecer en leche y para resistir a la fagocitosis por los neutrófilos. Es así, que se postula que el crecimiento de la bacteria auxotrófica en la glándula mamaria está limitado por la carencia de aminoácidos libres y péptidos. Consecuentemente, la proteólisis podría constituir un prerrequisito esencial para el crecimiento de este microorganismo que no exhibe actividad proteolítica detectable (Leigh y Lincoln, 1997). No obstante, se ha demostrado que *S. uberis* es capaz de activar específicamente el plasminógeno bovino y que este hecho es mediado por una proteína extracelular llamada factor activador del plasminógeno de *S. uberis* (PauA), cuyo peso molecular es de aproximadamente 30 KDa (Leigh y col., 1999; Rosey y col., 1999). El activador 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. Se sugiere que la activación del plasminógeno por PauA podría facilitar la colonización temprana de la glándula mamaria debido a que promueve la remoción de nutrientes (Leigh y col, 1999; Rosey y col, 1999). *In vitro*, se ha demostrado que PauA media la adquisición de plasmina en un medio que contiene plasminógeno y que los péptidos derivados de la caseína bovina por acción de la plasmina satisfacen algunos de los requerimientos de aminoácidos de esta bacteria. Durante la infección de la glándula mamaria *S. uberis* se encuentra predominantemente en la región luminal de los alveólos secretores y el tejido ductular, indicando que el crecimiento bacteriano ocurre en leche residual y recientemente sintetizada. Este ambiente es probablemente deficiente en péptidos y aminoácidos libres, por lo cual la activación del plasminógeno por PauA *in vivo* podría facilitar el crecimiento de esta bacteria debido a que afecta indirectamente la hidrólisis de caseína a péptidos que contienen aminoácidos esenciales (Leigh y Lincoln, 1997; Johnsen y col., 1999). Asimismo, la unión de plasmina en la superficie bacteriana permitiría la disponibilidad de péptidos próximos a la célula (Lincoln y Leigh, 1998). Además, la generación de plasmina permite la ruptura proteolítica de la fibrina y de proteínas del tejido conectivo, facilitando la penetración bacteriana de las barreras tisulares y su diseminación en los tejidos circundantes a la infección. El activador PauA no sería la única proteína con capacidad para activar el plasminógeno y favorecer así la habilidad de *S. uberis* para crecer en leche o infectar la glándula mamaria bovina (Ward y col., 2003). Johnsen y col. (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*. Los autores demostraron su actividad sobre plasminógeno bovino, ovino, equino, caprino, porcino, de conejo y humano. Por lo cual, PauB representa un nuevo activador de plasminógeno con amplia especificidad y de muy baja frecuencia. Se

podría argumentar que la expresión de *pauB* confiere poca ventaja a la cepa, limitando así su diseminación (Ward y Leigh, 2002). La mayoría de los hallazgos informados demuestran que la proteína PauA también podría ser empleada como antígeno para el posible desarrollo de una subunidad vacunal.

Por otro lado, *S. uberis* es un microorganismo muy versátil capaz de aprovechar los elementos de su huésped para sobrevivir y colonizar la glándula mamaria del bovino. Una de estas estrategias es la unión a la Lactoferrina (Lf) una proteína del suero que se encuentra normalmente en la leche y en las secreciones de la glándula mamaria de vacas no lactantes (Smith y Oliver, 1981). La unión a la Lf se produce por una molécula de adhesión de *S. uberis*, denominada SUAM la cual es codificada por el gen *sua*. Su peso molecular es de aproximadamente 112 KDa y ha sido identificada y parcialmente caracterizada (Oliver y col., 2004; Almeida y col., 2006). A partir de la proteína se determinó la secuencia teórica del DNA y fue confirmada por PCR y digestión enzimática. Posteriormente la verdadera secuencia fue elucidada y se encontró que posee un 99% de homología con la secuencia determinada teóricamente (Almeida y col., 2006). Se ha propuesto que esta molécula juega un importante rol en la patogénesis de la mastitis causada por *S. uberis* y es considerada un potencial factor de virulencia de éste microorganismo. Se sugiere que SUAM, por medio de su unión a la lactoferrina (Lf) y la posterior unión de esta proteína a un receptor presente en la superficie de la célula epitelial mamaria, facilitaría la adherencia bacteriana desencadenando la internalización de este patógeno dentro del citoplasma celular. La internalización provee un ambiente protector frente a la fagocitosis por neutrófilos y a los antimicrobianos presentes en la leche. Se considera que este es un evento temprano muy importante en el establecimiento de una nueva infección intramamaria (Almeida y col., 2006; Luther y col., 2008; Patel y col., 2009). Anticuerpos contra SUAM inhiben este proceso lo cual sugiere que SUAM podría ser un prometedor inmunógeno para el control de ésta infección (Almeida y col., 2006).

1.4 VACUNAS CONTRA LA MASTITIS PRODUCIDA POR *S. UBERIS*

Diferentes vacunas contra la mastitis han sido ensayadas en bovinos (Calzolari y col., 1997; Giraudo y col., 1997; Yancey, 2008).

El aumento de la frecuencia de las mastitis causadas por estreptococos ambientales ha dado lugar a un número de intentos por producir vacunas contra estos patógenos. Especialmente las investigaciones se han enfocado en desarrollar una vacuna contra *S. uberis* (Ruegg, 2005).

Los factores de virulencia asociados con la patogénesis de *S. uberis* aún no se han comprendido totalmente, lo cual constituye el mayor obstáculo para el desarrollo de medidas de prevención y estrategias para el control de la enfermedad. Consecuentemente, durante los

últimos años los esfuerzos se han centrado en identificar y caracterizar potenciales factores de virulencia involucrados en el proceso de infección por *S. uberis* con el objetivo de desarrollar inmunógenos que puedan ser potencialmente aplicados para inducir una respuesta inmune que evite las interacciones entre el patógeno y el hospedado y de este modo complementar las medidas de control existentes. Hasta el momento se han utilizado tres tipos de enfoques para desarrollar vacunas contra *S.uberis*: bacterinas, vacunas vivas y vacunas de subunidades (Calvinho, 2007). Las bacterinas son vacunas a base de bacterias inactivadas, las cuales utilizan numerosas proteínas y lipopolisacáridos relevantes desde el punto de vista inmunológico, en combinación con un adyuvante para inducir una protección fuerte y respuesta inmune de larga duración; que se han utilizado por vía local y parenteral. Si bien se logró cierta protección contra la cepa homóloga, las inmunoglobulinas generadas no promovieron la fagocitosis o destrucción de la bacteria por los neutrófilos. Las bacterinas contra *S. uberis* incluidas en vacunas polivalentes contra patógenos de mastitis, no tuvieron efecto sobre la incidencia de infección por estreptococos ambientales (Calvinho, 2007).

Se conoce que el empleo de cepas vivas como vacunas provee una respuesta inmune más fuerte y de mayor duración que cuando se emplean microorganismos muertos o sus subunidades. Los microorganismos pueden reproducirse en el huésped y producir antígenos no presentes en una vacuna preparada con microorganismos muertos. Estudios previos realizados en *S. aureus* han mostrado resultados satisfactorios en ensayos con animales a partir de cepas atenuadas (Reinoso y col., 2002). En *S. uberis*, se ha evaluado una vacuna por vía subcutánea, complementada con antígenos de pared bacteriana por vía intramamaria. Se obtuvo cierta protección contra la cepa homóloga pero no basada en acción opsónica, y como en el caso de la bacterina, no se desarrolló una respuesta que promoviera la fagocitosis o destrucción por neutrófilos. El efecto protector observado puede haber radicado en la disminución de la capacidad de *S. uberis* para colonizar la glándula mamaria. Estas conclusiones sentaron la base para desarrollar nuevas estrategias de vacunación que no incluyeran la actividad neutrofílica como defensa excluyente.

Entre las vacunas de subunidades, se menciona al factor activador del plasminógeno (PauA), asociado con la colonización temprana de la glándula mamaria, el cual fue incluido en un inmunógeno experimental como subunidad. Los estudios preliminares mostraron una protección entre el 37 al 62% contra la enfermedad clínica luego del desafío experimental con una cepa heteróloga y la recuperación de bacterias en leche fue menor en los animales vacunados comparados con los testigos. En la actualidad se intenta identificar nuevos factores que estén involucrados en interacciones con el hospedador, a través de la creación de mutantes isogénicos (Calvinho, 2007).

Investigaciones previas describen dos proteínas (PauA y SUAM) involucradas en la virulencia, la proteína PauA está presente en la mayoría de las cepas de *S. uberis* aisladas

de casos de mastitis clínica. Estudios realizados por Rosey y col., (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. Con respecto al gen *sua*, se ha informado que el mismo estaría conservado en las cepas de *S. uberis* (Luther y col. 2008). Por ende, ambas proteínas, resultan de interés para el desarrollo de un inmunógeno que confiera protección a la glándula mamaria (Yancey, 2008; Leigh J., 2003; Almeida y col., 2006).

Estudios previos han descripto que la vacunación con el factor activador de plasminógeno de *S. uberis* induce la producción de anticuerpos inhibitorios (Leigh y col., 1999). Por otro lado, Prado y col., (2011) observaron que la vacunación con una proteína recombinante SUAM y paralelamente, con un péptido de la porción N-terminal de dicha proteína, inducía la formación de anticuerpos que reducían la adherencia e internalización de *S. uberis* a la célula epitelial mamaria. De acuerdo a los datos informados por diversos autores (Leigh J., 2003; Almeida y col., 2006; Yancey, 2008), las proteínas SUAM y PauA podrían ser candidatos potenciales para el desarrollo de subunidades vacunales, para su utilización como inmunógenos con capacidad de inducir el sistema inmune y proteger a la glándula mamaria frente al desafío heterólogo.

Las vacunas dirigidas a los patógenos ambientales pueden reducir la proporción y severidad de la enfermedad clínica. El desarrollo de una vacuna dirigida a *S. uberis* debería estar basada en la capacidad de brindar protección cruzada contra grupos específicos de cepas relacionadas (Yancey, 2008). Por el momento, no existen vacunas comerciales disponibles que protejan contra la mastitis causada por estreptococos (Ruegg, 2005). La necesidad de formulación de vacunas ha dirigido la investigación hacia estudios que sirvan de base para el desarrollo de inmunógenos contra las mastitis a *S. uberis*. Cepas mutantes deficientes en algún factor de virulencia podrían ser potenciales candidatos.

1.5 SISTEMAS PARA LA OBTENCIÓN DE MUTANTES *S. UBERIS*

La búsqueda de mutantes requiere el desarrollo de nuevas estrategias y herramientas genéticas que faciliten el screening rápido de los clones recombinantes. La integración cromosomal y la inactivación de genes ha sido empleada con elementos conjugativos transponibles como Tn916, Tn919 y Tn1545 en Estreptococos (Fitzgerald y Gasson, 1988).

En bacterias Gram positivas no existen sistemas genéticos eficientes para el desarrollo de mutantes. Se requiere una alta eficiencia de transformación para permitir la detección de los eventos de baja frecuencia como la transposición y la recombinación dentro del cromosoma. Dado que la mayoría de las bacterias Gram positivas son pobremente transformables estas técnicas resultan limitadas. La necesidad de un sistema de

transformación eficiente puede ser resuelto por el uso de un plásmido termosensible (Ts). Aún si la frecuencia de transformación es baja, un replicón Ts podría primero establecerse y propagarse en una población bacteriana, y el subsecuente cambio de temperatura podría permitir la selección de los eventos de baja frecuencia como la transposición y la recombinación. Maguin y col. (1992), han desarrollado un plásmido Ts, denominado pWV01 para bacterias Gram positivas. Dado que los vectores Ts pueden ser establecidos a una baja temperatura en una población bacteriana antes de la selección de los integrantes, esto puede ser usado para la integración en bacterias pobremente transformables (Biswas y col., 1993).

Law y col., (1995) han descrito un sistema para la obtención de mutantes en bacterias Gram positivas, en el cual el uso combinado de dos vectores derivados del pWV01 con replicación condicional constituye una poderosa herramienta para la inactivación de genes cromosomales. En dicho sistema, la transformación de la cepa *L. lactis* MG1363 portadora del plásmido pVE6007 (un vector Ts derivado del plásmido pWV01) con el vector pORI19, permite la replicación de ambos plásmidos a 30°C, mientras que el cambio de temperatura a 37°C causa la integración del plásmido pORI19 al cromosoma bacteriano. Esta integración resulta estable y permite la identificación de mutantes a una temperatura de crecimiento óptima (Law y col., 1995).

Posteriormente, Leenhouts y col., (1996) para simplificar los procedimientos de clonado y extender la aplicación de los vectores pORI, construyeron un nuevo plásmido, denominado pORI280, el cual puede ser empleado en estrategias de reemplazamiento de genes cromosomales. Los plásmidos pORI poseen el origen de replicación del plásmido pWV01, carecen del gen que codifica para la proteína RepA, necesaria para el inicio de la replicación, de este modo son incapaces de replicar solos, necesitan que la proteína RepA sea provista *in trans* (Leenhouts y col., 1991). La construcción de los vectores de integración de los plásmidos pORI es posible gracias a la disponibilidad de cepas *helper* como *E. coli*, *B. subtilis* y *L. lactis*, capaces de producir la proteína RepA debido a que poseen incorporado en el cromosoma una copia del gen *repA* (cepas RepA⁺). Adicionalmente, el vector de integración pORI280 porta un gen de resistencia a Eritromicina (Em), como así también el gen reportero *lacZ* y un sitio de múltiple clonado (MCS). El gen *lacZ* en pORI280 está bajo el control del promotor P₃₂ el cual es reconocido tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. El MCS del vector contiene un sitio único de reconocimiento para enzimas de restricción que permite la inserción de fragmentos de ADN (Leenhouts y col., 1998). La presencia de un fragmento de ADN cromosomal en un plásmido pORI permite su integración por recombinación homóloga con el cromosoma en una cepa que no produce RepA. Particularmente, el plásmido pORI280 ha sido designado para mutar o deleccionar genes o insertar nuevos genes en el cromosoma. Las cepas que contienen una copia integrada del plásmido pORI280 son resistentes a Em y producen colonias azules en placas con Xgal

(Leenhouts y col., 1993; Leenhouts y col., 1996). Esta mutación es estable a 37°C dado que a menor temperatura el vector de integración se escinde.

Por otro lado, el pG⁺host es un plásmido Ts que deriva del vector pWV01, su termosensibilidad se debe a una mutación en el origen de replicación. Este vector es capaz de proveer la proteína de replicación RepA a los plásmidos pORI que si bien poseen el origen de replicación son incapaces de sintetizar dicha proteína. Este vector replica a una temperatura permisiva (28°C) en tanto que a una temperatura no permisiva (37°C) es incapaz de replicar.

Tales sistemas en los que se emplea el uso combinado de dos vectores de replicación condicional, derivados del plásmido pWV01, constituyen una importante estrategia para el desarrollo de mutantes (Leenhouts y col., 1998).

Hipótesis y Objetivos

El establecimiento de las infecciones intramamarias resultan de la interacción entre el microorganismo, el huésped y el medio ambiente. *S. uberis* es reconocido como el patógeno ambiental más importante implicado en mastitis bovina. Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo han mostrado la presencia de un genotipo más frecuente entre 40 cepas de *S. uberis* asociado a los genes *pauA* y *sua*, entre otros. La asociación de los genes *pauA* y *sua* a este genotipo permitió especular sobre la importancia potencial de estos factores de virulencia. A nivel mundial, sólo se ha descrito una estrategia de generación de mutantes por inserción al azar de *S. uberis* mediante la integración de pGh9:ISS1 en el cromosoma bacteriano. Teniendo en cuenta los antecedentes descritos se propone la obtención de mutantes de *S. uberis* deficientes en la síntesis de las proteínas PauA y SUAM.

1. HIPÓTESIS

Se establece como hipótesis que la mutagénesis sitio-dirigida mediante el uso combinado de dos tipos de vectores con replicación condicional, derivados del plásmido pWV01, permite la obtención de mutantes deficientes en los genes *pauA* y *sua*, asociados a la activación del factor activador del plasminógeno y a la capacidad de adherencia e internalización a las células epiteliales mamarias bovinas, respectivamente. De esta manera, estos determinantes genéticos de importancia potencial en la virulencia de *S. uberis* podrían ser utilizados en el futuro como base para el desarrollo de inmunógenos experimentales dirigidos al control de la mastitis causada por este patógeno.

2. OBJETIVO GENERAL

Obtener cepas mutantes de *S. uberis* deficientes en los genes *pauA* y *sua* mediante mutagénesis sitio-dirigida y caracterizar las cepas mutantes obtenidas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener cepas de *S. uberis* deficientes en los genes *pauA* / *sua*.
- Caracterizar preliminarmente a nivel genotípico las cepas mutantes de *S. uberis* mediante técnicas moleculares.
- Caracterizar preliminarmente a nivel fenotípico las cepas mutantes de *S. uberis*.

Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo están descriptos en la tabla 1. En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los mapas de los plásmidos empleados.

Tabla 1: Cepas bacterianas y plásmidos

Cepas bacterianas	Descripción	Referencias
<i>E. coli</i> DH5 α	Δ lac U169- ϕ 80 lac Z Δ M15, hsdR17, recA1, endA1, gyr A96, thi-1, relA1. Cepa supresora deficiente en recombinación, utilizada para el crecimiento de plásmidos y cósmidos. Permite α -complementación.	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> EC1000 RepA ⁺ pORI280 (*)	Cepa portadora del plásmido pORI280. RepA ⁺ , produce la proteína RepA <i>in trans</i> necesaria para la replicación del plásmido pORI280.	Leenhouts y col., 1996
<i>E. coli</i> EC1000 RepA ⁺ (*)	RepA ⁺ , produce la proteína RepA <i>in trans</i> necesaria para la replicación del plásmido pORI280. Carece del plásmido pORI280.	Leenhouts y col., 1996

Plásmidos	Descripción	Referencias
pGEM [®] -T Easy	Vector lineal, derivado de pUC, de alto N° de copias. Presenta un residuo de timina en cada extremo saliente 3'. Posee un peso molecular de 3015 pb, Ap ^r . Presenta una mutación lacZ Δ M15. Permite la α -complementación.	Promega
pORI280 (*)	Em ^r , lacZ ⁺ , ori ⁺ del plásmido pWV01. Replica sólo en cepas que proveen la proteína RepA <i>in trans</i> .	Leenhouts y col., 1996
pG ⁺ host3 (*)	Cm ^r , origen de replicación Ts derivado del plásmido pWV01 (esta replicación termosensitiva fue obtenida por una mutación en el ori del vector pWV01). Provee <i>in trans</i> las funciones de replicación del plásmido pORI280.	Maguin y col., 1992

(*): Enviado cordialmente por el Dr. Raúl Raya, CERELA-CONICET, Tucumán.

Figura 1. Mapa correspondiente al vector de clonado pGEM®-T Easy.

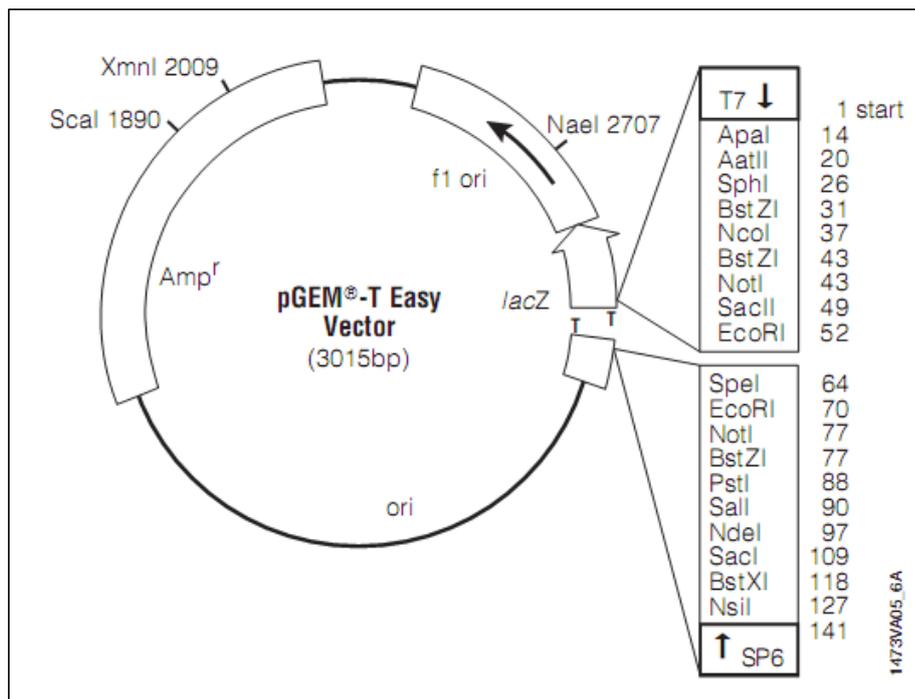


Figura 2. Mapa correspondiente al vector pORI280.

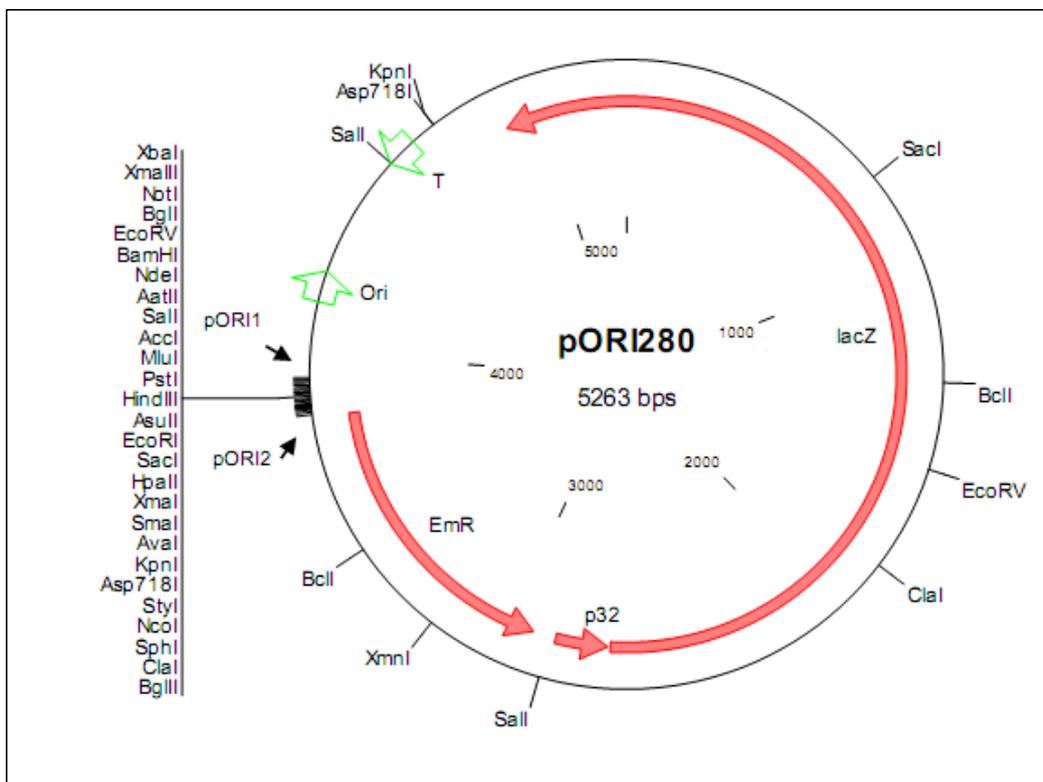
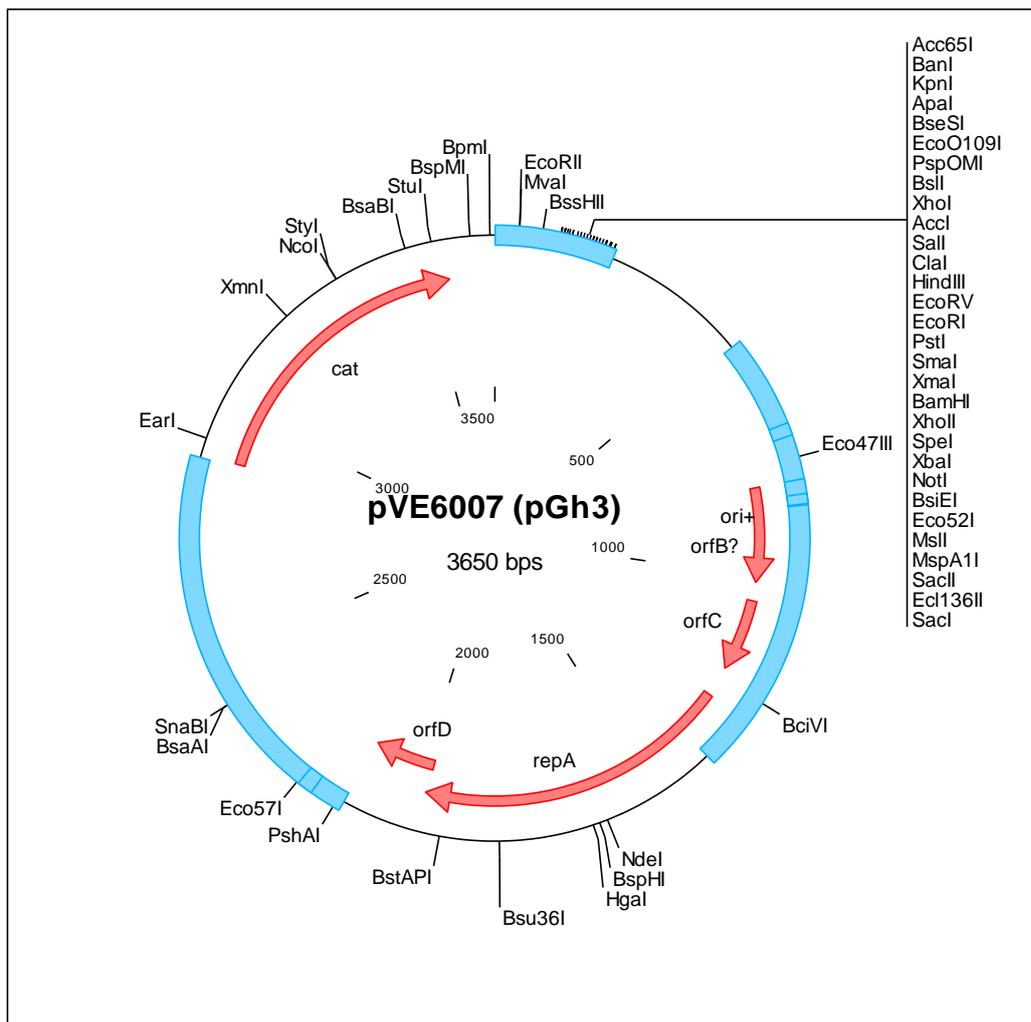


Figura 3. Mapa correspondiente al vector pG⁺host3.



2. Condiciones de cultivo y conservación de las cepas

Para el crecimiento de las cepas de *Streptococcus uberis* se utilizó el medio Todd Hewitt (TH) suplementado con cloranfenicol (Cm) a concentración final de 5 µg/ml. Los cultivos se incubaron en estufa a 30°C. En el caso de las mutantes, las mismas fueron seleccionadas en Em 5 µg/ml y la incubación se realizó a 37°C.

Las cepas *E. coli* DH5α, *E. coli* EC1000 RepA⁺ pORI280 y *E. coli* EC1000 RepA⁺, se hicieron crecer en medio Luria-Bertani (LB). Cuando correspondió se adicionó Ampicilina (Ap) a concentraciones finales de 150 µg/ml ó Eritromicina (Em) a concentraciones finales de 125 µg/ml respectivamente. La incubación se realizó en estufa o agitación, a 37°C.

Para la conservación de las cepas un volumen de 0.8 ml de un cultivo en fase exponencial fue homogeneizado con 0.2 ml de glicerol estéril y conservado a -20°C.

3. Soluciones y Medios de cultivo

3.1 Medios de cultivo

LB: para 1000 ml: 10 g Bacto-triptona, 5 g Extracto de levadura, 10 g NaCl, llevar a volumen final con agua destilada.

Agar-LB, Ap₅₀ µg/ml: agar-LB con Ap a concentración final de 50 µg/ml.

Agar-LB, Ap₅₀ µg/ml; Xgal e IPTG: agar-LB con Ap a concentración final de 50 µg/ml. Dejar solidificar y agregar para cada placa 45 µl de H₂O estéril, 40 µl de Xgal (5-bromo-4 cloro-3 indolil-β-galactopiranosido) y 15 µl de IPTG (inductor gratuito del gen de la β-galactosidasa) poner primero el agua y luego los otros reactivos sobre la gota de agua, distribuir con espátula de Drigalsky y dejar secar las placas destapadas en estufa a 37°C durante 2 h.

SOB: para 1000 ml: 20 g Bacto-triptona, 5 g Extracto de levadura, 0.5 g NaCl y 10 ml KCl 250 mM. Esterilizar en autoclave y antes de usar agregar 5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2M.

SOC: medio idéntico al SOB, excepto que contiene 20 mM de glucosa.

TH: para 1000 ml pesar 30 g del medio y disolver en agua destilada.

Agarosa-leche descremada: para 10 ml de medio (una placa), pesar 0.1 g de agarosa disolver en 9 ml de PBS-Lisina 20 mM, luego adicionar 1 ml de leche descremada 20%. Para la preparación de leche descremada al 20%, se pesaron 20 gr de leche y fueron hidratados con 100 ml de agua estéril.

- Para la preparación de medios sólidos fue agregado 1.5 % p/v de agar-agar.
- La esterilización fue realizada en autoclave a 121°C, 1 atmósfera, durante 15 min.

3.2 Antibióticos

Solución stock de Ap 50 mg/ml: Pesar la droga y llevar a volumen final con agua destilada estéril.

Solución stock de Em 5 mg/ml: Pesar la droga y llevar a volumen final con etanol absoluto.

Solución stock de Cm 30 mg/ml: Pesar la droga y llevar a volumen final con etanol absoluto.

3.3 Soluciones Minipreps para extracción de ADN plasmídico

Solución I:

- Glucosa 50 mM
- Tris-Cl (pH 8.0) 25 mM
- EDTA (pH 8.0) 10 mM
- Lizosima 0.1 mg/l (una punta de espátula)

Solución II: (preparar en el momento)

- NaOH 0.2 N
- SDS 1%

Solución III: (Para 100 ml)

- Acetato de potasio 5 M: 60,0 ml
- Ácido acético glacial: 11.5 ml
- H₂O: 28.5 ml

3.4 Extracción y amplificación de ADN

- Buffer TE 1 X: Tris 10 mM – EDTA 5 mM pH 7,8.
- Buffer TE: Tris 10 mM - EDTA 1mM pH 7,5.
- Cloroformo - alcohol isoamílico (49:1 v/v)
- Cloruro de sodio (NaCl) 5 M.
- Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): 100 mM (Promega)
- Etanol 100%.
- Fenol equilibrado con Tris 0,1 M - pH 8.
- Lizozima 50 mg/ml.
- Proteinasa K 20 mg/ml.
- RNAsa 10 mg/ml.
- SDS 20 % (p/v) en Tris 50 mM – EDTA 20 mM pH 7,8.
- STE : 0,1 M NaCl, 10 mM Tris HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8).

- Agua tridestilada filtrada estéril libre de nucleasas (Promega)
- Buffer Taq Green 5x: pH 8,5 (Promega)

- GoTaq DNA Polimerasa: 500 U, concentración 5 U/μl (Promega)
- MgCl₂: 25 mM (Promega)

3.5 Kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Membrane Binding Solution:

- Isotiocianato de guanidina 4.5 M
- Acetato de potasio 0.5 M, pH 5.0

Membrane Wash Solution: (después de la adición de etanol)

- Acetato de potasio 10 mM, pH 5.0
- Etanol 80%
- EDTA 16.7 μM, pH 8.0

3.6 Determinación de actividad PauA

Buffer PBS: (Para 80 ml)

- NaCl: 0.8 g
- KCl: 0.02 g
- Na₂HPO₄: 0.144 g
- KH₂PO₄: 0.024 g

Llevar a pH 7.4 con HCl

Stock Lisina 100 mM: pesar 0.18 g de lisina, hidratar con 10 ml de agua destilada estéril.

Buffer PBS-Lisina 20 mM: se prepara con 2 ml del Stock de lisina 100 mM y 8 ml de PBS.

Plasminógeno bovino 20 mM: el vial conteniendo plasminógeno bovino fue hidratado con 200 μl de PBS-Lisina 20mM. Luego de hidratado el vial, se tomaron 4 μl y se adicionaron 196 μl de PBS-Lisina, para obtener 200 μl de plasminógeno 20 mM.

4. Obtención de mutantes *pauA / sua* de *S. uberis*

Para la obtención de las mutantes se clonaron fragmentos del ADN cromosomal de interés en el plásmido pORI280 y se recuperaron en la cepa *E. coli* EC1000 RepA⁺. Los plásmidos recombinantes fueron posteriormente empleados para transformar la cepa *S. uberis* seleccionada, la cual previamente fue transformada con el plásmido pG⁺host3.

4.1 Clonado de los genes *pauA / sua* en el vector de clonado pGEM®-T Easy

A las cepas de *S. uberis* SU73 y SU106, se les realizó la extracción de ADN cromosomal y posteriormente se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de los genes *pauA* y *sua*. Luego, los fragmentos amplificados de cada gen fueron ligados en ensayos diferentes al vector de clonado pGEM®-T Easy. Esto se realizó debido a que dichos fragmentos poseen una adenosina sobresaliente en ambos extremos 3'.

4.1.1 Extracción de ADN cromosomal

La extracción de ADN se realizó según las condiciones descriptas por Jayarao y col., (1991, 1992). Una alícuota de 1,5 ml de un cultivo de toda la noche de *S. uberis* fue centrifugada durante 5 min a 7000 rpm. El precipitado obtenido fue resuspendido en 350 µl de buffer TE 1X, procedido de agitación en vórtex. Las bacterias fueron tratadas con 20 µl de lisozima (50 mg/ml) durante 60 min a 37 °C y luego lisadas con 20 µl de SDS (20%) y 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) por incubación durante 2 h a 37 °C. La precipitación de proteínas fue realizada con la adición de 200 µl de NaCl 5 M seguida por 15 seg de agitación y posterior centrifugación a 7000 rpm durante 8 min. El sobrenadante extraído fue mezclado con 200 µl de Tris-fenol y 200 µl de Cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La fase acuosa superior fue extraída por centrifugación durante 10 min a 7000 rpm. El ADN fue precipitado por el agregado de 2 volúmenes de etanol 100% y 30 µl de acetato de sodio 1 M seguido de una incubación de 2 h a -70°C. El ADN resultante fue obtenido por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min, secado en estufa a 37 °C y resuspendido en 30 µl de buffer TE incubando luego a 4 °C toda la noche (Reinoso y col., 2005). Las muestras de ADNs fueron conservados a -20°C.

El ADN fue cuantificado mediante comparación visual de la intensidad de las bandas en un gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio (BrEt) con respecto a un marcador de ADN de concentración conocida.

4.1.2 Amplificación de los genes *pauA* / *sua* mediante PCR

Los genes *pauA* y *sua* fueron amplificados mediante PCR en reacciones independientes, empleando *primers* específicos. En la tabla 2 se detallan los *primers* y programas empleados.

Tabla 2: *Primers* y programas empleados

Gen	Cebadores 5'- 3'		Programa	Referencia
<i>sua</i>	ACGCAAGGTGCTCAAGA GTT	TGAACAAGCGATTCTCAG	1	Reinoso y col., 2011
<i>pauA</i>	GAGATTCCTCTCTAGAT ATCA	GGGTGCAGATCCGTTAAA AAATGACATTAATAT	2	Ward y Leigh, 2002

1: 94°C 2 min, (93°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1.30 min) x 30, 72°C 5 min.

2: 94°C 2 min, (94°C 60 seg, 54°C 60 seg y 72°C 90 seg) x 30, 72°C 5 min.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo 20 ng de ADN molde, 10 µl de buffer GoTaq Green 5X, 3 mM MgCl₂, 1 µM de cada cebador, 0.4 µM de cada dNTP y 1 U de Taq Polimerasa, agua libre de nucleasas. En la reacción se incluyó un control negativo, adicionando agua en lugar de DNA y un control positivo, empleando un DNA de una cepa de *S. uberis* previamente caracterizada. La amplificación fue llevada a cabo en un Termociclador MJ Research PTC-220.

4.1.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v) teñido con BrEt a concentración final 1 µg/ml. La corrida electroforética se llevó a cabo en buffer de corrida TAE 1X a voltaje constante (90 V) durante 60 minutos. Cinco microlitros de cada muestra fueron sembrados empleando un marcador de peso molecular de 100 pb. El gel fue visualizado por transiluminación con luz UV y luego digitalizado en un digitalizador (Alpha Innotech Corporation) y almacenados en formato TIFF (Tagget Image Files Format) para su posterior análisis.

4.1.4 Ligación de los productos amplificados en el vector pGEM®-T Easy

Los productos amplificados de los genes *sua* y *pauA* fueron ligados en el vector comercial pGEM®-T Easy. Este vector de clonado posee una timidina terminal en ambos

extremos 3' lo que permitió ligarlo con los productos de PCR amplificados. En la tabla 3 se muestran los componentes del sistema.

Tabla 3: Componentes del sistema de clonado pGEM®-T Easy

Product	Size	Cat.#
pGEM®-T Easy Vector System I	20 reactions	A1360
Includes:		
• 1.2µg	pGEM®-T Easy Vector (50ng/µl)	
• 12µl	Control Insert DNA (4ng/µl)	
• 100u	T4 DNA Ligase	
• 200µl	2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	

En la tabla 4 se muestran las reacciones de ligación ensayadas.

Tabla 4: Reacciones de ligación

	Reacción estándar	Control (+)	Control Background
2X Buffer Ligasa	5µl	5µl	5µl
T4 DNA Ligasa (3 U/µl)	1µl	1µl	1µl
Inserto control DNA	-	2µl	-
Producto de PCR	X µl(*)	-	-
Vector pGEM®-T Easy (50 ng)	1µl	1µl	1µl
Agua libre de nucleasas	1µl	1µl	3µl

(*) La reacción estándar se llevó a cabo con una relación inserto/vector de 1:1, la cual es aconsejada como óptima. Para ambos genes la cantidad apropiada de producto de PCR para agregar a la reacción de ligación fue calculada por medio de la siguiente ecuación:

$$\frac{ng \text{ de vector } \times \text{ tamaño (Kb) del inserto}}{\text{tamaño (Kb) del vector}} \times \text{relación molar inserto/vector} = ng \text{ de inserto}$$

Las reacciones fueron incubadas durante 3 horas a temperatura ambiente.

4.1.5 Obtención de células *E. coli* DH5α competentes

Previo a la transformación, células *E. coli* DH5α competentes fueron obtenidas según la técnica descrita por Sambrook y col, 1989. De un stock de células *E. coli* DH5α congeladas en glicerol al 0.8%, se tomó una ansada y se sembró en medio LB el cual fue incubado a 37°C durante 18 h. Las colonias crecidas se recogieron con ansa estéril y se resuspendieron en 5 ml de caldo LB, con posterior incubación a 37°C en agitación por un período de 18-20 h. Posteriormente, un volumen de 2 ml del cultivo se resuspendió en 10 ml de caldo LB a 37°C en agitación hasta alcanzar una $DO_{620nm} = 0.2$. Una vez llegada a la DO se colocó el cultivo en hielo durante 10 min. Se tomaron 5 ml del cultivo y se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en 10 ml de glicerol 10% frío. Los tubos se mantuvieron 10 min en hielo, posteriormente fueron centrifugados nuevamente y el precipitado fue resuspendido en un volumen final de 2 ml de GYT. Por último se fraccionaron 200 µl en tubos Eppendorf y se conservaron a -20°C. Las células competentes obtenidas fueron sembradas en el medio correspondiente para determinar la viabilidad antes de su empleo.

4.1.6 Transformación de células competentes *E. coli* DH5α

Para cada uno de los genes ensayados se llevó a cabo la transformación de células competentes *E. coli* DH5α, la misma fue realizada según el protocolo descrito en el manual del vector comercial pGEM®-T Easy. Los tubos conteniendo las células competentes fueron descongelados en hielo durante 30 min. Posteriormente, a 100 µl de células competentes se le adicionaron 3 µl de cada una de las mezclas de ligación (reacción estándar, control positivo y control background). Los tubos se mantuvieron 30 min a 0°C, luego se llevó a cabo un shock térmico de 2 min a 42°C, posteriormente se conservaron en hielo por 2 min y se les agregó 800 µl de medio SOC precalentado. El contenido de los tubos se transfirió a un tubo de ensayo estéril. Los mismos se incubaron en agitación a 37°C durante 1 h. Finalmente, 100 µl de cada uno de los tubos fueron sembrados por diseminación con espátula de Drigalsky en medio LB suplementado con $Ap_{150 \mu g/ml}$, IPTG y Xgal. Las placas fueron incubadas a 37°C por un período de 48 h. Posteriormente, la frecuencia y eficiencia de transformación fueron determinadas empleando las siguientes fórmulas:

Eficiencia de transformación:

$$\frac{(n^{\circ} \text{ de col. transformantes})^a}{(\mu g \text{ ADN})} = \text{eficiencia de transformación}$$

α : el número de colonias transformantes se determinó por recuento en placa en presencia del antibiótico correspondiente.

Frecuencia de transformación:

$$\frac{\text{eficiencia de transformación}}{n^{\circ} \text{ de col. viables}} = \text{frecuencia de transformación}$$

4.1.7 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

Se seleccionaron colonias blancas crecidas en placas LB con Ap₁₅₀ µg/ml, Xgal e IPTG, las mismas fueron recogidas con ansa estéril y sembradas en tubos conteniendo caldo LB suplementado con Ap₁₅₀ µg/ml. La incubación se realizó a 37°C en agitación por 18 h. La extracción de plásmido se realizó por el método de lisis alcalina según la técnica descrita por Birnboim y Doly, (1979). Se transvasaron 1.5 ml de los cultivos a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 7000 rpm durante 2 min. Se removió el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en 100 µl de Solución I y se incubó 15 min en hielo-agua.

Posteriormente se agregaron 200 µl de Solución II, los tubos fueron mezclados por inversión rápida y suave durante 3 min. Luego, se adicionaron 150 µl de Solución III, mezclando suavemente por inversión durante 2-3 min. Se dejaron en hielo-agua 15 min. Los tubos se centrifugaron a 11000 rpm a temperatura ambiente durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf, cuidando de no transferir parte del material precipitado, blancuzco. Se adicionaron 300 µl de cloroformo - alcohol isoamílico (49:1 v/v), agitando vigorosamente. La mezcla fue centrifugada a 11000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió sin tocar la interfase a un tubo limpio. Las muestras fueron tratadas con 3 µl de RNAsa (10 mg/ml) e incubadas a 37°C 1 h. El ADN fue precipitado con 2 volúmenes de etanol mezclando por inversión y conservándose a -20°C toda la noche.

La corrida electroforética se realizó en un gel de agarosa 0.8% bajo las mismas condiciones descritas anteriormente en la sección 4.1.3. Previamente, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejaron secar a 37°C durante 15 min para permitir la evaporación del etanol residual. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas. Para la siembra se emplearon 5 µl de cada una de las muestras. Un marcador de 1 Kb fue utilizado como marcador de peso molecular.

4.2 Subclonado de los genes *pauA* / *sua* en el vector pORI280

4.2.1 Liberación y purificación del inserto

El plásmido purificado obtenido de la extracción de ADN plasmídico de colonias blancas teóricamente consiste en un plásmido recombinante: el vector pGEM®-T Easy portando un inserto, sea éste el fragmento amplificado del gen *pauA* o del gen *sua* según corresponda. Los plásmidos recombinantes fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* para la liberación del inserto. Las reacciones de restricción se realizaron según se detalla en la tabla 5. La incubación se realizó en estufa a 37°C por un período de 2 h.

Tabla 5: Digestión enzimática

Componente	Volumen
ADN	10 µl
Buffer H 10X	2 µl
Albúmina Bovina 10X	2 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
H ₂ O libre de nucleasas	5 µl
Volumen final	20 µl

Los productos de digestión enzimática fueron sembrados en un gel de agarosa 0.8 % tal como se detalló anteriormente. La banda de interés (banda de inserto) fue escindida del gel y purificada empleando el Kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una corrida electroforética del fragmento purificado con el fin de corroborar la presencia de ADN.

4.2.2 Aislamiento y digestión enzimática del plásmido pORI280

La cepa *E. coli* EC1000 RepA⁺ pORI280 se hizo crecer en medio LB suplementado con Em₁₂₅ µg/ml a 37°C durante toda la noche. Se realizó la extracción de ADN plasmídico y la corrida electroforética. Se sembraron 10 µl del producto obtenido, incluyéndose también un marcador de peso molecular. Posteriormente se procedió a la digestión enzimática del plásmido pORI280 con la enzima de restricción *EcoRI*.

4.2.3 Ligación de los insertos purificados con el plásmido pORI280

La ligación del inserto purificado del gen *sua* al plásmido pORI280 se llevó a cabo en una relación inserto/vector de 1:1, según se detalló en la sección 4.1.4. En tanto que, para la ligación del inserto purificado del gen *pauA* al plásmido pORI280 se ensayaron las reacciones de ligación (A y B) detalladas en la tabla 6. Esto se realizó debido a que, en la corrida electroforética del producto de digestión enzimática del plásmido recombinante pGEM:*pauA* no se observó sólo una banda correspondiente a inserto si no que se observaron más de una banda, dichas bandas fueron escindidas del gel, purificadas y posteriormente empleadas en ensayos de ligación al vector pORI280.

Tabla 6: Reacciones de ligación A y B

	Reacción A	Reacción B
2X Buffer Ligasa	5µl	5µl
T4 DNA Ligasa (3 U/µl)	1µl	1µl
Vector pORI280	5µl	1µl
Inserto <i>pauA</i> purificado	7,6µl	1,5µl
Agua libre de nucleasas	3µl	7µl

4.2.4 Preparación de células competentes *E.coli* EC1000 RepA⁺

Para la obtención de células *E. coli* EC1000 RepA⁺ competentes se siguió el procedimiento descrito para *E. coli* DH5α. En este caso, la cepa se hizo crecer en medio LB líquido o sólido, según corresponda, adicionado con Em₁₂₅ µg/ml incubándose a 37 °C. Posteriormente, para determinar la viabilidad de las células obtenidas las mismas fueron sembradas en medio LB incubándose a 37°C durante 18 h.

4.2.5 Transformación de células competentes *E.coli* EC1000 RepA⁺

Para la transformación se siguió el protocolo empleado para *E. coli* DH5α. Las bacterias transformantes fueron sembradas por diseminación en medio LB con Em₁₂₅ µg/ml e incubadas a 37°C durante 48 h. Asimismo, la frecuencia y eficiencia de transformación fueron determinadas empleando las fórmulas descriptas en la misma sección.

4.2.6 Selección de transformantes pORI:*sua* / pORI:*pauA*

A las colonias transformantes crecidas en LB adicionado con Em₁₂₅ µg/ml se les realizó extracción de ADN plasmídico en mini prep. Posteriormente se realizó una extracción en maxi preparación (maxiprep), según Sambrook y col., (1989). Para maxiprep, las colonias transformantes fueron sembradas en 50 ml de medio LB suplementado con Em₁₂₅ µg/ml, la incubación se realizó en agitación a 37°C durante 18 h. Posteriormente, se centrifugaron 15 ml del cultivo a 7000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido en STE, nuevamente se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 15 min, descartándose posteriormente el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 2 ml de Solución I con vórtex, incubándose en hielo durante 15 min. Luego, se agregaron 4 ml de Solución II, se mezcló por inversión durante 2 min, inmediatamente fueron adicionados 3 ml de Solución III, y se incubó 15 min en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm, 4°C durante 25 min. Luego, se adicionó un volumen de cloroformo y se centrifugó a 6000 rpm a 18°C durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio, se agregaron 2 volúmenes de etanol y se conservó a -20°C por 2 h. Posteriormente, se centrifugó a 9000 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de buffer TE. Se distribuyó en alícuotas de 350 µl. Para cada alícuota se agregó 100 µl de AcNH₄ y 1 ml de etanol, conservándose a -20°C por 30 min. Luego, se centrifugó a 13000 rpm por 7 min, descartándose el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y fueron agregados 30 µl de buffer TE. Por último se conservó a -20°C. La corrida electroforética se llevó a cabo como se detalló previamente en la sección 4.1.3. Se sembraron 10 µl del producto obtenido, incluyéndose también un marcador de peso molecular. Esta maxi prep de ADN plasmídico se realizó con el objetivo de permitir el aumento del número de células portadoras del plásmido recombinante y así facilitar la recuperación de dicho plásmido.

Para determinar la presencia de los plásmidos pORI:*sua* ó pORI:*pauA* en los clones transformantes, se realizaron reacciones de amplificación mediante PCR, empleando *primers* específicos diseñados con el software Primer3. Para la detección del plásmido pORI:*sua* se realizó una reacción de PCR utilizando el ADN plasmídico de la extracción como ADN molde. Se llevó a cabo una reacción de PCR con los *primers* que se listan en la tabla 2 para detectar si el fragmento del gen *sua* se hallaba presente. Como control positivo se incluyeron ADNs de las cepas *sua114* y *sua210*. Otra reacción de PCR fue realizada empleando *primers* específicos diseñados para amplificar aproximadamente 300 pb del plásmido pORI280 que flanquean el inserto clonado (Figura 2). Para dicha reacción se utilizó el ADN de la extracción como ADN molde. Se incluyó como control positivo el plásmido pORI280. Los *primers* fueron denominados pORI1 y pORI2 de secuencia pORI1 5' CAC GGG TCG AGA TCT AAT CG 3' y

pORI2 5' CCA ACT GGC TCA AGG GTT TA 3'. Las condiciones de ciclado empleadas fueron las siguientes: 94°C 2 min, (93°C 1min, 53°C 1min, 72°C 1.30 min) x 30, 72°C 5 min. Similarmente, para la detección del plásmido pORI:*puaA* se realizó una reacción de PCR empleando *primers* específicos de *pauA* los cuales fueron diseñados con el software Primer3 y se denominaron *pauA1* 5' GGGAATTCCACCCACTACCT 3' y *pauA2* 5' GGGTCCTTAGCCATGATACG 3'.

Con los productos de PCR obtenidos se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 0.8% según las condiciones detalladas previamente en la sección 4.1.3. Se sembraron 10 µl del producto obtenido, incluyéndose también un marcador de peso molecular.

4.3 Transformación en cepas de *S. uberis* con pORI:*sua* / pORI:*pauA*

4.3.1 Preparación de células competentes de *S. uberis*

Previo a los ensayos de transformación, las cepas de *S. uberis* SU73 y SU106 fueron sembradas en tubos con 3 ml de caldo TH suplementado con Cm 5 µg/ml (el antibiótico se adicionó para mantener la presión de selección en las cepas y evitar la pérdida del plásmido pG⁺host3). Los tubos fueron incubados en estufa a 30°C, durante toda la noche. Posteriormente, 500 µl fueron inoculados en 20 ml de TH con Cm₅ µg/ml y se dejó crecer en estufa a 30°C hasta alcanzar una DO_{600nm} = 0.4. Una vez llegada a la DO se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C para producir la precipitación de las células. Las células fueron lavadas 2 veces con 3 ml de agua bidestilada estéril (4000 rpm a 4°C durante 10 min). Posteriormente fueron lavadas con solución de sacarosa 0.5 M - glicerol 10% y resuspendidas en 200 µl de la misma. Por último se fraccionaron en alícuotas de 50 µl y se conservaron a -70°C. Las células competentes obtenidas fueron sembradas en medio TH para determinar su viabilidad.

4.3.2 Transformación de las cepas de *S. uberis* con el vector pG⁺host3

La transformación del plásmido pG⁺host3 en cepas de *S. uberis* SU73 y SU106 fue llevada a cabo mediante electroporación con el equipo Gene Pulser (Bio-Rad). Se adicionaron 8 µl de plásmido pG⁺host3 a 50 µl de células competentes previamente descongeladas en hielo. La mezcla fue transferida a una cubeta de 0.2 cm y se procedió a la electroporación empleando los siguientes parámetros: 25 µF, 1.8 KV, 600 Ω durante 2.5 msec (Maguin y col., 1996). Inmediatamente, se adicionaron 1 ml de TH con sacarosa 6 %, la incubación se realizó en estufa a 30°C durante 90 min. Posteriormente, para la selección de los transformantes fueron sembrados por diseminación 100 µl en placas con medio TH suplementado con Cm₅ µg/ml. La incubación se realizó en estufa a 30°C durante 18 h.

4.3.3 Ensayos de estabilidad del vector pG⁺host3 en cepas de *S. uberis*

Se determinó la estabilidad del plásmido pG⁺host3 en las cepas transformantes *S. uberis* SU73 y SU106 fue determinada. Para realizar dichos ensayos, las células se hicieron crecer a 30°C en medio TH suplementado con Cm 5 µg/ml durante 18 h. Dos mililitros del cultivo fue inoculado en medio TH con Cm₅ µg/ml a 30°C durante 3h. Posteriormente, se realizaron diluciones hasta 10⁻³ en dos tubos con caldo TH sin Cm. Luego se plaqueó la dilución 10⁻¹ en TH agar 1.2% con y sin Cm (5 µg/ml; tiempo 0). Se incubaron los caldos a 30°C y 37°C durante 8 h. Se plaquearon las diluciones 10^{-4/-5} en TH agar 1.2% con y sin Cm. Las placas agarizadas se incubaron a 30°C durante 48 h. Se realizó el recuento de colonias. El porcentaje de pérdida del plásmido fue comparado empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ pérdida } (T^\circ) = \frac{(N^\circ \text{ colonias en ausencia de Cm}) - (N^\circ \text{ colonias en presencia de Cm}) \times 100}{N^\circ \text{ colonias en ausencia de Cm}}$$

4.3.4 Transformación en *S. uberis* pG⁺host3 con los plásmidos pORI:*sua* / pORI:*pauA* y selección de mutantes

La transformación del plásmido pORI:*sua* / pORI:*pauA* en *S. uberis* pG⁺host3 fue llevada a cabo mediante electroporación con el equipo Gene Pulser (Bio-Rad) según se detalló anteriormente. Luego de la electroporación, la mezcla se resuspendió en 1 ml de TH con sacarosa 6 %, suplementado con Em 50 ng/ml. La incubación se realizó en estufa a 30°C durante 90 min. Luego, la concentración de Em se aumentó a 5 µg/ml y la incubación se continuó por 90 min bajo las mismas condiciones (Law y col., 1995). Posteriormente, los tubos fueron incubados en estufa a 37°C durante 2 h. Para evaluar la capacidad de crecer en presencia de los diferentes antibióticos se sembraron 100 µl por diseminación con espátula de Drigalsky en placas con medio TH adicionado con Em₅ µg/ml, TH con Cm₅ µg/ml y TH con Em₅ µg/ml y Cm₅ µg/ml. Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 18 h. Las mutantes fueron seleccionadas sólo en presencia de Em₅ µg/ml a 37°C debido a que a esa temperatura el plásmido pG⁺host3 Ts es no replicativo y se produce la integración del plásmido pORI280 recombinante al cromosoma bacteriano.

5. Caracterización de las mutantes obtenidas de *S. uberis*

La caracterización de las mutantes obtenidas se realizó a nivel genotípico y fenotípico. Para el estudio genotípico se extrajo ADN de las cepas mutantes y se realizaron ensayos de PCR con *primers* específicos.

5.1 Extracción de ADN cromosomal

Las colonias crecidas en medio TH con Em₅ µg/ml fueron tomadas una por una con un palillo estéril y sembradas en caldo TH suplementado con Em₅ µg/ml. La incubación se realizó a 37°C durante 18 h. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN cromosomal según las condiciones descritas por Jayarao y col. (1991, 1992). Las bacterias crecidas en agar sangre durante 18 h a 37 °C fueron recogidas con ansa estéril y resuspendidas en 1 ml de buffer TE 1X (10 mM Tris – 5 mM EDTA; pH 7,8). El precipitado obtenido por centrifugación de la suspensión bacteriana a 7000 rpm durante 5 min fue resuspendido en 350 µl de buffer TE 1X (10 mM Tris – 5 mM EDTA; pH 7,8) procedido de agitación en vórtex. Las bacterias fueron tratadas con 20 µl de lisozima (50 mg/ml) durante 60 min a 37 °C y luego lisadas con 20 µl de SDS (20% p/v en 50 mM Tris – 20 mM EDTA; pH 7,8), 3 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y 3 µl de RNAsa (10 mg/ml) por incubación durante 2 h a 37 °C. La precipitación de proteínas fue realizada con la adición de 200 µl de NaCl 5 M seguida por 15 seg de agitación y posterior centrifugación a 7000 rpm durante 8 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 de 2 h a -70°C. El ADN resultante fue obtenido por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min, secado en estufa a 37 °C y resuspendido en 30 µl de buffer TE (10 Mm Tris – 1 mM EDTA; pH 7,5) incubando a 4 °C toda la noche (Reinoso y col., 2005). Los ADNs fueron conservados a -20°C para evitar su degradación por la actividad enzimática de las DNAsas.

La cuantificación fue realizada por visualización en geles de agarosa al 0,8 % en buffer TAE 1X teñidos con 0,8 µl de BrEt. En dicho gel se sembraron 4µl de cada muestra y un marcador de peso molecular de 1 Kb. En cada caso se adicionó buffer Taq Green 5X y se llevó a un volumen final de 10 µl con buffer TE (10 Mm Tris – 1 mM EDTA; pH 7,5). La electroforesis fue llevada a cabo durante 1 h a 70 V.

5.2 PCR para la detección del gen *sua*

Para detectar la presencia del gen *sua* en el cromosoma, se realizó PCR utilizando los *primers* detallados en la tabla 2. Se empleó como ADN molde el ADN obtenido de la extracción de ADN cromosomal. Con los productos de PCR obtenidos se realizó una corrida electroforética con 10µl del producto obtenido, incluyéndose también un marcador de peso molecular.

5.3 Secuenciamiento de los productos *sua* amplificados

El fragmento obtenido fue escindido y enviado a secuenciar al CERELA - CONICET. Las secuencias fueron analizadas en la base de datos de GenBank utilizando el programa BLASTX2.0.10.

5.4 PCR para la detección del gen *pauA*

Para detectar la presencia del gen *pauA* en el cromosoma, se realizaron ensayos de PCR utilizando los *primers* y condiciones previamente detalladas en la sección 4.2.6. Se empleó como ADN molde el ADN obtenido de la extracción de ADN cromosomal. Con los productos de PCR obtenidos se realizó una corrida electroforética.

5.5 Determinación de Factor activador de plasminógeno en mutantes *pauA*

La presencia de actividad PauA sobre el plasminógeno bovino fue chequeada en placas agarosa-leche descremada (Leigh, 1993). Para ello un cultivo en caldo TH suplementado con Em₅ µg/ml de las cepas mutantes *pauA* fue incubado a 37°C durante 18 h. Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm a 4°C por 20 min. Un volumen de 30 µl de sobrenadante fue incubado 1 h a 37°C con plasminógeno bovino 20 mM en PBS-Lisina 20 mM a pH neutro libre de plasmina en relación 1:1. El control negativo consistió en partes iguales de sobrenadante de cultivo y PBS-Lisina 20 mM. Un volumen de 40 µl de la mezcla fue depositado en pocillos practicados en placas de agarosa 1% adicionado con 2% de leche (Leigh, 1994). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. La producción de factor activador de plasminógeno se detectó por conversión del plasminógeno a plasmina y posterior actividad caseinolítica en placas agarosa-leche descremada, observándose la formación de un halo en aquellas colonias positivas a dicha prueba.

Resultados y Discusión

1. Obtención de mutantes *pauA* / *sua* de *S. uberis*

Con el objetivo de profundizar el estudio de los factores de virulencia en cepas de *S. uberis* con genotipos prevalentes, en el presente trabajo se propuso obtener cepas mutantes de *S. uberis* deficientes en los genes *pauA* y *sua* mediante mutagénesis sitio-dirigida. Las mismas fueron obtenidas a partir de dos cepas de *S. uberis* denominadas SU73 y SU106 correspondientes a un genotipo prevalente obtenido por electroforesis de campos pulsantes (PFGE) informado en estudios anteriores (Reinoso y col., 2013). Previamente, los autores determinaron la presencia de 11 potenciales genes asociados a la virulencia mediante ensayos de PCR, entre ellos *pauA* y *sua* (Reinoso y col., 2011).

Para la obtención de las mutantes, se amplificó un fragmento interno del gen *pauA* que codifica para un activador del plasminógeno. Asimismo, se amplificó un fragmento interno del gen *sua* que codifica para la molécula de adhesión SUAM. Dichos fragmentos se clonaron en el plásmido pORI280 y se recuperaron en la cepa *E. coli* EC1000 RepA⁺. Los plásmidos recombinantes fueron posteriormente empleados para transformar la cepa *S. uberis* seleccionada. En la figura 4 se muestra una representación esquemática de la metodología realizada.

1.1 Clonado de los genes *pauA* / *sua* en el vector de clonado pGEM®-T Easy

Los fragmentos internos amplificados de los genes *pauA* y *sua* fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy según se detalló en la sección 4.1. de Materiales y Métodos. Posteriormente fueron liberados mediante digestión enzimática con el fin de obtener fragmentos de ambos genes con sitios de reconocimiento para la enzima *EcoRI* para su ligación en el vector de clonado pORI280. El plásmido pORI280 tiene un sitio múltiple de clonado que no facilita la selección de los plásmidos recombinantes mediante inactivación de un fenotipo. Una de las estrategias es generar *primers* con sitios de restricción definidos en el fragmento a clonar. En este trabajo se decidió clonar los genes en el vector de clonado pGEM®-T Easy de modo que posteriormente sean liberados con una enzima de corte común para pORI280.

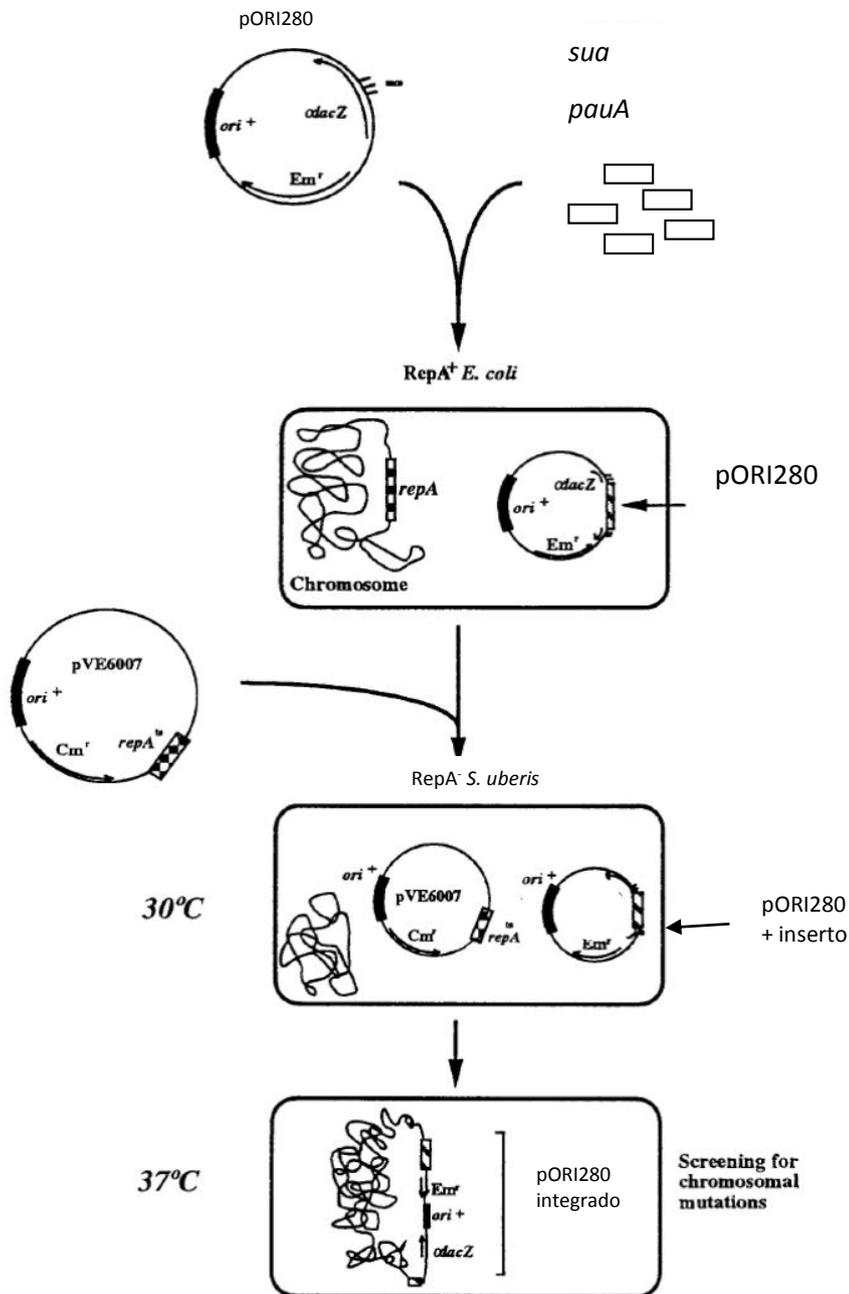


Figura 4. Representación esquemática de la transformación y subsecuente integración del vector pORI280.

1.1.1 Amplificación de los genes *pauA* / *sua* mediante PCR

En el presente trabajo se amplificaron fragmentos de 1200 pb y 776 pb correspondientes a los genes *pauA* y *sua* respectivamente. Para corroborar la amplificación de los fragmentos se llevó a cabo una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5%. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos.

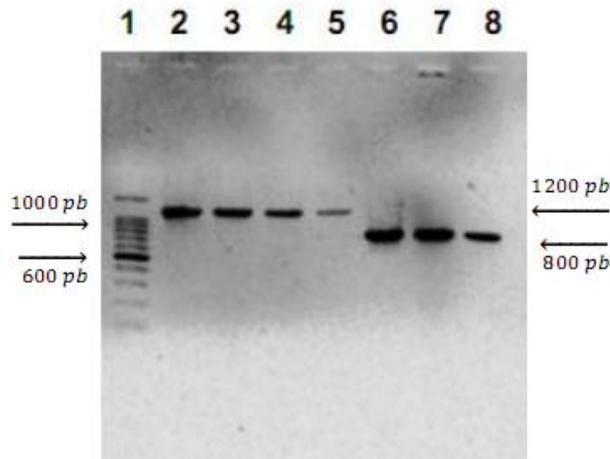


Figura 5. Productos amplificados de los genes *sua* y *pauA*. Corrida electroforética en gel de agarosa 1.5 %. Calle 1: marcador de peso molecular (PM) de 100 pb (Promega); calle 2: control (+) *pauA*; calle 3, 4, 5: productos amplificados del gen *pauA*; calle 6: control (+) *sua*; calles 7, 8: productos amplificados del gen *sua*.

1.1.2 Ligación de los productos amplificados en el vector pGEM®-T Easy

Se realizó la reacción de ligación de los fragmentos amplificados con el vector de clonado. De ambos genes la cantidad apropiada de producto de PCR que debió adicionarse a la reacción de ligación fue calculada por medio de la ecuación descrita en Materiales y Métodos:

Para el gen *pauA*

$$\frac{50 \text{ ng de vector} \times 1.2 \text{ Kb inserto}}{3.0 \text{ Kb vector}} \times \frac{1}{1} = 20 \text{ ng inserto}$$

Para el gen *sua*

$$\frac{50 \text{ ng de vector} \times 0.77 \text{ Kb inserto}}{3.0 \text{ Kb vector}} \times \frac{1}{1} = 12.8 \text{ ng inserto}$$

Según la fórmula empleada se necesitaron 20 ng y 12.8 ng de los genes *pauA* y *sua* respectivamente. Para determinar el volumen en microlitros del producto de PCR correspondientes a 20 ng y 12.8 ng de inserto se estimó la concentración de ADN a partir de la corrida electroforética. Se estableció que las bandas visualizadas correspondían a aproximadamente 50 ng de ADN, dado que se sembraron 5 μ l de cada muestra, entonces la concentración de ADN de los productos de PCR corresponde a 10 ng/ μ l. Por lo tanto, 20 ng del gen *pauA* correspondieron a 2 μ l del producto de PCR y 12.8 ng del gen *sua* a 1.3 μ l del producto de PCR.

1.1.3 Transformación y selección de colonias portadoras de plásmido recombinante.

Previo al empleo de las células competentes se realizaron ensayos de viabilidad, obteniéndose en dichos ensayos un crecimiento confluyente. Posteriormente, la mezcla de ligación se empleó para transformar células *E. coli* DH5 α competentes. Debido a que el vector de clonado pGEM®-T Easy permite ser utilizado en α -complementación y confiere resistencia a Ap, las colonias transformantes fueron seleccionadas en un medio apropiado con el agregado de Ap, IPTG y Xgal. Asimismo, se obtuvo un valor de eficiencia de transformación de alrededor de 1×10^3 *ufc*/ μ ADN. Se considera que $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ *ufc*/ μ DNA sería un valor de eficiencia de transformación adecuado para obtener 10-30% de clones recombinantes con la mezcla de ligación. Si bien la eficiencia de transformación obtenida no fue la óptima, los resultados obtenidos fueron alentadores para continuar los ensayos.

Se obtuvieron aproximadamente 20 colonias blancas y 30 azules. Las colonias blancas corresponden a colonias portadoras del plásmido recombinante ya que son incapaces de sintetizar la porción amino terminal de la β -galactosidasa dado que el gen se encuentra interrumpido por el inserto (fragmento de 1200 pb o 776 pb correspondiente al gen *pauA* o *sua*, respectivamente). Las colonias azules corresponden a colonias que portan plásmido sin inserto ya que la enzima β -galactosidasa es sintetizada y degrada el cromógeno Xgal otorgando la coloración a la colonia. Se seleccionaron las colonias blancas y a partir de dichas colonias se procedió a la extracción de ADN plasmídico (Figura 6).

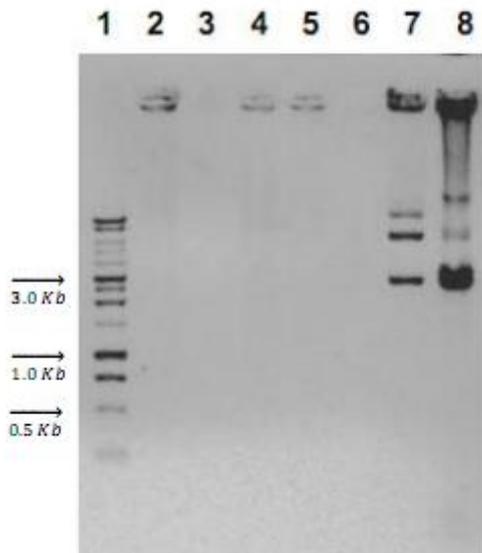


Figura 6. Extracción de ADN plasmídico de colonias blancas *sua* y *pauA*. Corrida electroforética en un gel de agarosa 0.8%. Calle 1: marcador de PM de 1 Kb (Promega); calle 7: extracción de ADN plasmídico de una colonia blanca *sua*; calle 8: extracción de ADN plasmídico de una colonia blanca *pauA*.

1.2 Subclonado de los genes *pauA* / *sua* en el vector pORI280

1.2.1 Liberación y purificación del inserto

Los plásmidos recombinantes de colonias blancas previamente extraídos, fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* para la liberación de los insertos (*pauA* o *sua* según corresponda). En las figuras 7 y 8 se muestran las corridas electroforéticas de los productos de digestión. La figura 7 corresponde a la digestión del plásmido recombinante portador del fragmento del gen *sua* observándose una banda de aproximadamente 800 bp. En la figura 8 se observan 2 bandas de aproximadamente 600 bp y 300 bp correspondientes a la digestión del plásmido recombinante portando el inserto del gen *pauA*. Se observan 2 bandas, lo que demuestra la presencia de un sitio interno de reconocimiento para la enzima *EcoRI*. Para verificar el sitio interno de restricción se empleó el software NEBCutter y el análisis de la secuencia amplificada del gen *pauA* reveló la presencia de un sitio interno de reconocimiento para la enzima *EcoRI* (Figura 9). Posteriormente, las bandas de aproximadamente 800 pb del gen *sua* y de 600 pb del gen *pauA* fueron escindidas del gel y purificadas empleando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

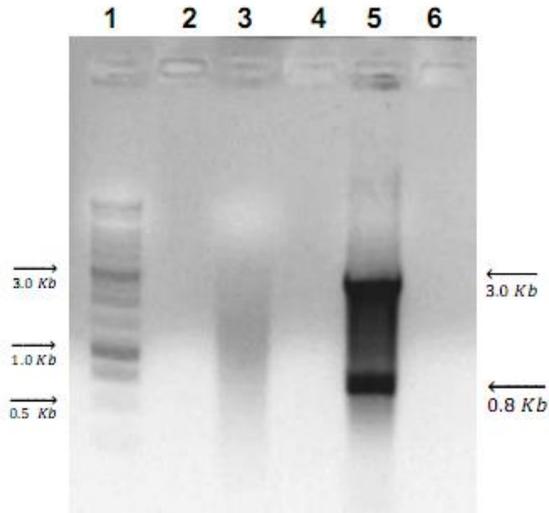


Figura 7. Corte con *EcoRI* del plásmido recombinante pGEM:*sua*. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: marcador de PM de 1 Kb (Promega); calle 5: bandas correspondientes al fragmento *sua* liberado (0.8 Kb) y al plásmido pGEM®-T Easy (3.0 Kb).

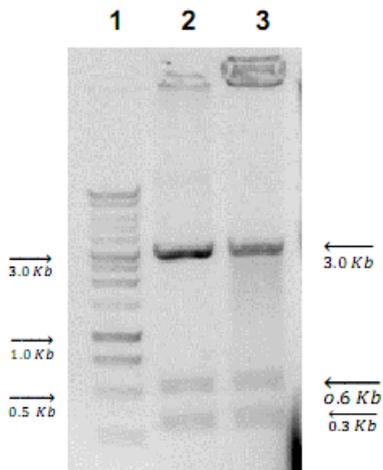


Figura 8. Corte con *EcoRI* del plásmido recombinante pGEM:*pauA*. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: marcador de PM de 1 Kb (Promega); calles 2 y 3: bandas de 600 pb y 300 pb correspondientes al inserto *pauA* liberado.

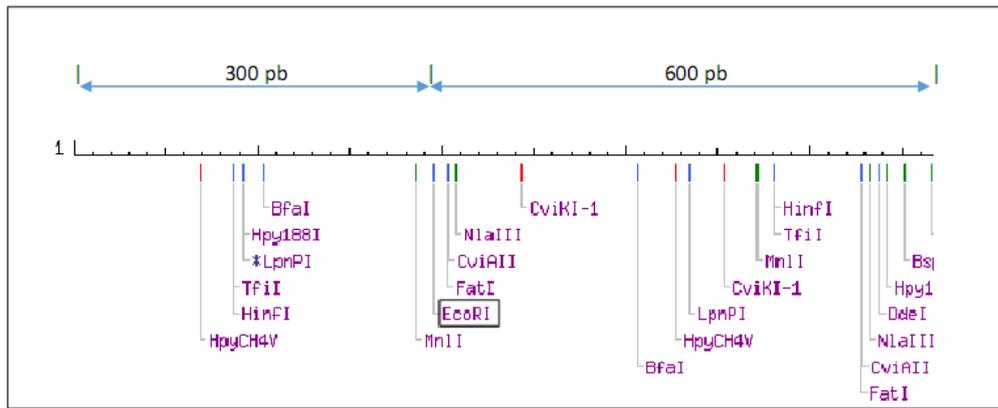


Figura 9. Análisis de la secuencia amplificada del gen *pauA* con el software NEBCutter. Se observa la presencia de un sitio interno de reconocimiento para la enzima *EcoRI*.

1.2.2 Aislamiento y digestión enzimática del plásmido pORI280

En forma simultánea, se realizó la extracción del vector de clonado pORI280 a partir de la cepa *E. coli* EC1000 RepA⁺ pORI280 (Figura 10). Posteriormente se llevó a cabo su digestión enzimática con la enzima *EcoRI*.

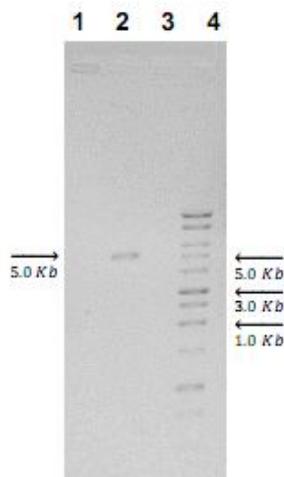


Figura 10. Extracción del plásmido pORI280. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 2: extracción de ADN plasmídico del vector pORI280; calle 4: marcador de PM de 1 Kb (Promega).

1.2.3 Transformación y selección de transformantes

Se determinó la viabilidad de células *E. coli* EC1000 RepA⁺ competentes previamente obtenidas, en dichos ensayos se observó un crecimiento confluyente.

Los fragmentos de los genes *sua* y *pauA* previamente digeridos y purificados fueron ligados en el vector pORI280 en reacciones independientes. El vector pORI:*sua* ó pORI:*pauA* fue empleado para transformar cepas de *E. coli* EC1000 RepA⁺ competentes. Dado que el plásmido de integración pORI280 confiere resistencia a Em, los transformantes fueron seleccionados en un medio apropiado suplementado con Em_{125 µg/ml}. De dichas transformantes se determinó la eficiencia de transformación obteniéndose un valor aproximado de 1×10^4 *ufc*/µ ADN. Si bien el valor de eficiencia obtenido no es el óptimo, aún así se considera aceptable.

A las colonias resultantes se les realizó la extracción de ADN plasmídico para confirmar la presencia de plásmido pORI280 recombinante. Al realizar la corrida electroforética se observaron bandas poco nítidas, por lo que se decidió realizar extracciones maxiprep. La dificultad en visualizar bandas nítidas de ADN plasmídico podría deberse a la reducida masa extraída, aún realizando una extracción maxiprep. De este modo se recurrió a la reacción de PCR, por ser una técnica altamente sensible, para detectar la presencia de plásmidos recombinantes e inserto en los transformantes.

Para detectar el plásmido recombinante pORI:*sua* se realizaron dos reacciones de PCR independientes. Una reacción de PCR se realizó con los *primers* que se listan en la tabla 2, para determinar si el fragmento del gen *sua* se hallaba presente. Como control positivo se incluyeron ADNs de las cepas *sua114* y *sua210* previamente caracterizada (Reinoso y col., 2011). Otra reacción de PCR fue realizada empleando *primers* específicos detallados en la sección 4.2.6. Los mismos fueron diseñados para amplificar un fragmento de aproximadamente 300 pb del plásmido pORI280 que flanquean el sitio múltiple de clonado. Se incluyó como control positivo el plásmido pORI280 enviado cordialmente por el Dr. Raúl Raya. En la figura 11 se observan los resultados obtenidos.

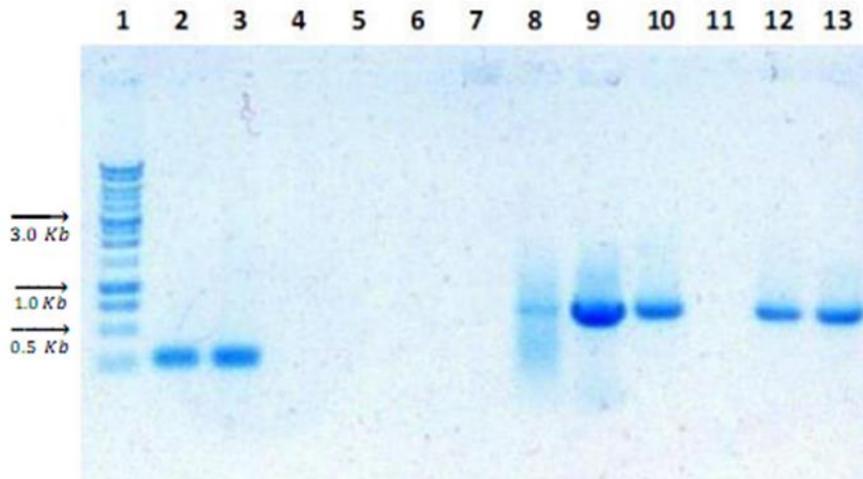


Figura 11. Detección del plásmido pORI:*sua* mediante reacción de PCR. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: marcador de PM de 1 Kb (Promega); calle 2: control positivo de pORI280; calle 3: amplicón pORI280; calles 4 a 7: amplicones pORI transformantes; calles 8 y 9: controles positivos gen *sua114* y *sua210*; calles 10 a 13: amplicones gen *sua* de cepas transformantes

Para detectar el plásmido recombinante pORI:*pauA* se realizó reacción de PCR empleando nuevos *primers* específicos diseñados para amplificar 600 pb de uno de los fragmentos del gen *pauA*. Los resultados de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos no se ha incluido debido a que la visualización de la bandas fue muy tenue.

Por otro lado se verificó la presencia del plásmido pORI280 en las cepas transformantes. Para ello, además de ser sembradas en un medio apropiado suplementado con Em₁₂₅ µg/ml, las mismas fueron sembradas en placas con medio TH con la adición de Em₁₂₅ µg/ml y Xgal. Todas las cepas transformantes crecieron en presencia del antibiótico y produjeron colonias azules en presencia de Xgal.

1.3 Transformación en *S. uberis* con pORI:*sua* / pORI:*pauA*

1.3.1 Transformación de las cepas de *S. uberis* con el vector pG⁺host3 y ensayo de estabilidad del plásmido pG⁺host3

Se evaluó la transformación de las cepas *S. uberis* SU73 y SU106 con el pG⁺host3 (Cm^r) como así también su termosensibilidad. Los transformantes fueron capaces de crecer en presencia de Cm a 30°C. Posteriormente, se determinó la estabilidad del plásmido pG⁺host3 en las cepas transformantes.

El porcentaje de pérdida del plásmido fue calculado empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ pérdida } (T^\circ) = \frac{(N^\circ \text{ colonias en ausencia de Cm}) - (N^\circ \text{ colonias en presencia de Cm}) \times 100}{N^\circ \text{ colonias en ausencia de Cm}}$$

Los resultados obtenidos del recuento de colonias se listan en las tablas 7 y 8.

Tabla 7: Porcentaje de pérdida del plásmido en la cepa *S. uberis* SU73

Horas	Temperatura (T°)			
	30°C		37°C	
	s/Cm	Cm	s/Cm	Cm
0	1376 (x10 ⁻¹)*	1600 (x10 ⁻¹)*		
8	47 (x10 ⁻⁵)*	31 (x10 ⁻⁵)*	236 (x10 ⁻⁵)*	93 (x10 ⁻³)*

*: número de unidades formadoras de colonias

% de pérdida a 30°C: 34%

% de pérdida a 37°C: 99%

Tabla 8: Porcentaje de pérdida del plásmido en la cepa *S. uberis* SU106

Horas	Temperatura (T°)			
	30°C		37°C	
	s/Cm	Cm	s/Cm	Cm
0	1088 (x10 ⁻¹)*	860(x10 ⁻¹)*		
8	44 (x10 ⁻⁵)*	35 (x10 ⁻⁵)*	1080 (x10 ⁻⁵)*	32 (x10 ⁻⁴)*

*: número de unidades formadoras de colonias

% de pérdida a 30°C: 20%

% de pérdida a 37°C: 99%

De acuerdo a los resultados el porcentaje de pérdida fue óptimo, ya que a 37°C se obtuvo un 99% y a 30°C entre un 20 y un 34%. Dichos resultados fueron alentadores para transformar las cepas seleccionadas.

1.3.2 Transformación de *S. uberis* pG⁺host3 con el plásmido pORI:*sua* / pORI:*pauA* y selección de mutantes

Previamente a la transformación se obtuvieron células competentes de *S. uberis* SU73 y SU106 (pG⁺host3) para ello se sembraron en caldo TH suplementado con Cm 5 µg/ml y se incubaron a 30°C. El antibiótico se adicionó para mantener la presión de selección en las cepas y evitar la pérdida del plásmido pG⁺host3. Luego se ensayó la viabilidad de las células obteniéndose crecimiento confluyente en placas con medio LB.

Posteriormente los plásmidos recombinantes pORI:*sua* / pORI:*pauA* se emplearon para transformar mediante electroporación las células competentes de *S. uberis* SU73 y SU106 (pG⁺host3). Los transformantes que incorporaron el plásmido recombinante pORI:*pauA* ó pORI:*sua* fueron capaces de crecer en un medio apropiado suplementado con los siguientes antibióticos: I) TH con Em₅ µg/ml (la resistencia a Em es otorgada por el plásmido pORI280 recombinante); II) TH con Cm₅ µg/ml (la resistencia a Cm es proporcionada por el plásmido pG⁺host3); III) TH con Em₅ µg/ml + Cm₅ µg/ml (la resistencia a Em y Cm es proporcionada por los vectores pORI280 recombinante y pG⁺host3 respectivamente). Sin embargo, la selección de mutantes sólo se realizó en placas con medio TH suplementado con Em₅ µg/ml e incubadas a 37°C dado que, a esa temperatura el plásmido pG⁺host3 Ts es no replicativo por lo cual la resistencia a Cm se perdería y conjuntamente con el cambio de temperatura de 30°C a 37°C se produciría la integración por recombinación homóloga del plásmido pORI:*pauA* / pORI:*sua* con el cromosoma bacteriano. Si bien el plásmido pG⁺host3 es un vector Ts y no replicativo a 37°C se ha demostrado que el cambio de temperatura de 30°C a 37°C no produce la pérdida total del plásmido (Law y col., 1995). Para producir la pérdida total del plásmido sería necesario incubar la mezcla de transformación al menos durante 3 h a 37°C y luego continuar la incubación durante 180 min a 30°C antes de plaquearse en medio TH suplementado con Em₅ µg/ml e incubarse a 37°C.

Cinco cepas mutantes para el gen *sua* (SU1, SU2, SU3, SU4 y SU5) y 6 cepas para el gen *pauA* (*pauASU1*, *pauASU2*, *pauASU3*, *pauASU4*, *pauASU5*, *pauASU6*) fueron seleccionadas para la posterior caracterización.

2. Caracterización de mutantes *pauA* / *sua* de *S. uberis*

Las mutantes previamente obtenidas fueron caracterizadas a nivel genético y fenotípico. Para la caracterización genotípica se extrajo ADN cromosomal de los clones seleccionados y posteriormente se realizaron ensayos de PCR con *primers* específicos.

2.1 PCR para la detección del gen *sua*

Se determinó la presencia del gen *sua* en el cromosoma de las cepas mutantes seleccionadas mediante reacciones de PCR para la cual se emplearon los *primers* detallados en la tabla 2 de Materiales y Métodos. Se incluyó como control positivo la cepa *sua210*. En la figura 12 puede observarse la corrida electroforética correspondiente a los productos de PCR obtenidos.

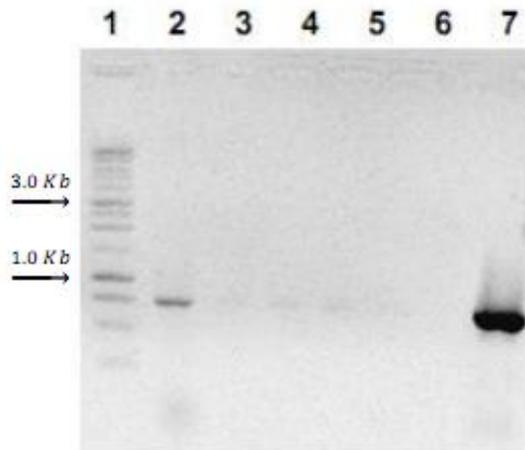


Figura 12. Detección del gen *sua* en mutantes *S. uberis* mediante reacción de PCR. Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: marcador de PM de 1 Kb (Promega); calles 2,3,4,5, 6: prod. de PCR de cepas mutantes *sua*; calle 7: producto de PCR de cepa *sua210* (control positivo).

Se observaron bandas correspondientes a los productos amplificados de mayor peso molecular que el control.

2.2 Secuenciamiento de los productos *sua* amplificados

Una de las bandas obtenidas en la reacción de PCR para detectar la presencia del gen *sua* en cepas mutantes fue enviada a secuenciar y posteriormente analizada en la base de datos de GenBank utilizando el programa BLASTX 2.0.10. La secuencia mostró corresponder al gen *sua*, aunque la muestra enviada resultó tener impurezas. En la figura 13 se muestra el fenograma obtenido.

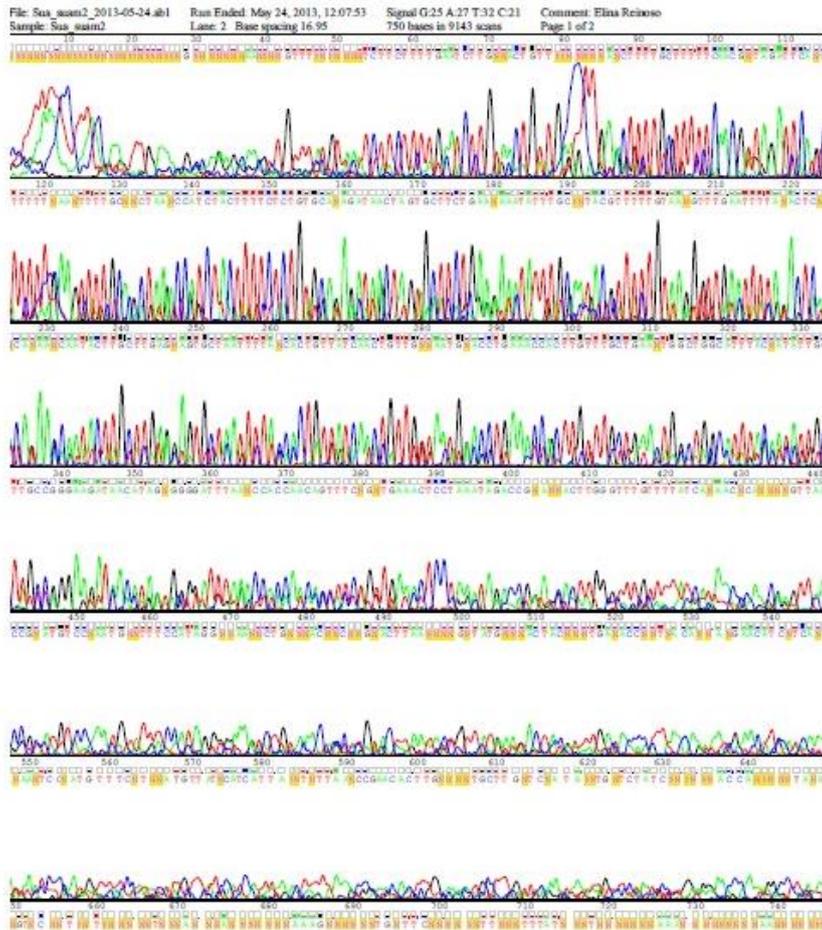


Figura 13. Fenograma de la secuencia amplificada del gen *sua*.

2.3 PCR para la detección del gen *pauA*

La presencia del gen *pauA* en el cromosoma de las cepas mutantes fue determinada mediante ensayos de PCR utilizando los *primers* y las condiciones previamente detalladas. Se empleó como ADN molde el obtenido de la extracción cromosomal. En la figura 14 se muestran los productos de amplificación obtenidos.

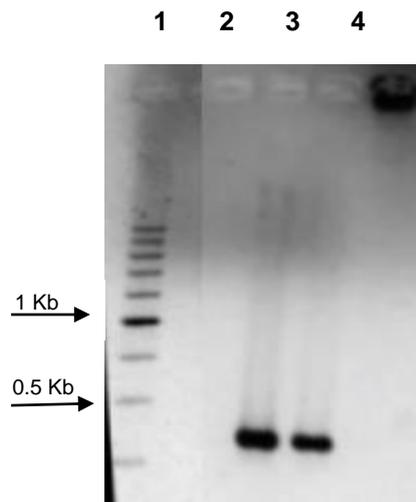


Figura 14. Detección del gen *pauA* en mutantes *S. uberis* mediante reacción de PCR Corrida electroforética en gel de agarosa 0.8%. Calle 1: marcador de PM de 1 Kb (Promega); calles 3 y 4, prod. de PCR de cepas mutantes *pauA*.

2.4 Determinación de Factor activador de plasminógeno en mutantes *pauA*

Se determinó la presencia de actividad PauA sobre el plasminógeno bovino en placas de agarosa-leche descremada. Se emplearon como control positivo cepas de *S. uberis* previamente caracterizadas como positivas (Lasagno y col., 2011). Los resultados obtenidos pueden observarse en la figura 15.

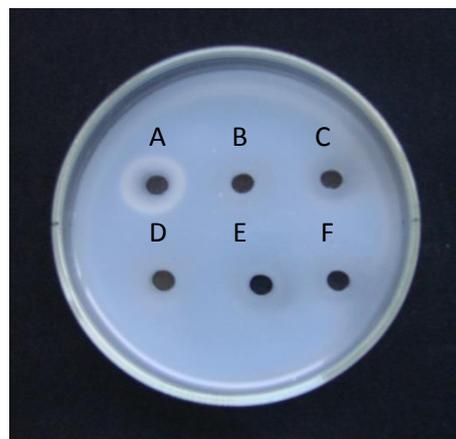


Figura 15. Placa agarosa-leche descremada. Pocillo A: control positivo, pocillo B: cepa mutante pauA2, pocillo C: cepa mutante pauA5, pocillos D, E y F: controles negativos.

En el presente trabajo se obtuvieron cepas mutantes de *S. uberis* *sua*⁻ y *pauA*⁻, mediante mutagénesis sitio-dirigida. Se empleó una estrategia combinada con dos vectores Ts, derivados del plásmido pWV01: los plásmidos pORI280 y pG⁺host3. Este sistema aplicado para generar mutantes en bacterias Gram positivas es similar al desarrollado por Law y col., (1995) en el cual se emplea el vector pORI19. En dicho vector el sitio de múltiple clonado (MCS) se encuentra dentro del gen *lacZ* de modo que el clonado de un inserto interrumpe el gen facilitando el screening de colonias portadoras de plásmido recombinante por α -complementación. En tanto que, en el vector pORI280 el MCS no interrumpe el gen *lacZ* de modo que se dificulta el screening de colonias portadoras de plásmido recombinante debido a que no puede realizarse por α -complementación. Aún así, el sitio múltiple de clonado de pORI280 contiene sitios únicos de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción lo que permite la inserción de fragmentos de ADN cromosomal.

La presencia de un fragmento del gen *sua* o *pauA* en el plásmido pORI280 permitió la integración cromosomal por recombinación homóloga en cepas de *S. uberis* que no producen RepA (RepA⁻). Un plásmido termosensible (pG⁺host3) fue empleado como “helper” del vector pORI280. Resulta importante destacar que en la bibliografía nacional e internacional no se han descrito ensayos de mutantes en *S. uberis* mediante la metodología empleada en el presente trabajo.

PERSPECTIVAS

Con los ensayos realizados previamente se llevó a cabo una caracterización preliminar de las cepas mutantes *pauA* / *sua* de *S.uberis* obtenidas mediante mutagénesis sitio-dirigida. Se propone la realización de las siguientes técnicas con el fin de completar la caracterización de las mutantes obtenidas.

1. Ensayos de adherencia en mutantes *sua*

Con el fin de determinar la capacidad de adherencia de las mutantes *sua*, se realizarán ensayos en células MAC-T.

2. Electroforesis de campos pulsantes (PFGE)

Con el objetivo de caracterizar genóticamente las cepas mutantes obtenidas se realizarán ensayos de electroforesis de campos pulsantes (PFGE) de las cepas salvajes y de las cepas mutantes, para el análisis del perfil de bandas obtenido.

3. Southern blot e hibridación

La técnica se realizará según el protocolo estándar de Southern blot (Sambrok, 1989) con sondas diseñadas específicamente para hibridar con: a) un fragmento del vector pORI280 (con el fin de corroborar la integración del plásmido al cromosoma), b) fragmentos de los genes *sua* y *pauA* (para determinar la inserción del fragmento en el cromosoma).

4. Secuenciar la/s banda/s hibridada/s

Las bandas con marca serán enviadas a secuenciar con el fin de analizar su secuencia.

5. SDS-PAGE y Western blot

Cepas salvajes y cepas mutantes obtenidas serían analizadas por SDS-PAGE para comparar el perfil proteico obtenido. Para dicho análisis debe tenerse en cuenta que la cepa salvaje produce proteínas cuya masa molecular es de 112 KDa para SUAM y 30 KDa para la proteína PauA. Los resultados obtenidos podrían confirmarse mediante Western blot utilizando anticuerpos anti-SUAM, anti-PauA como sonda.

Conclusión

- En este trabajo este trabajo hemos demostrado que el uso combinado de dos vectores de replicación condicional derivados del plásmido pWV01 constituye una importante estrategia para la inactivación de genes cromosomales permitiendo así el desarrollo de mutantes en *S.uberis*.
- Se obtuvieron cepas de *S. uberis* alteradas a nivel fenotípico y genotípico en los genes *pauA* / *sua* mediante mutagénesis sitio-dirigida

Bibliografía

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

Almeida, R.A., Luther, D.A., Park, H.M., Oliver, S.P. (2006). Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). Vet. Microbiol. 115, 183–191.

Almeida, R.A., Prado, M.E., Luther, D.A., Oliver, S.P. (2010). Antibodies in serum from cows vaccinated with *Streptococcus uberis* Adhesion Molecule (SUAM) inhibit adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. In: Proc. 2010 Intl. Dairy Federation Mastitis Conference p. 679.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513–1523.

Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J. Bacteriol. 175:3628–3635.

Booth, J.M. (1981). The importance of udder health in relation to milk quality improvement and control. Milk Quality Improvement and Control. Eds. J.D. Collins and J. Hannan. University College Dublin. pp. 1-11.

Bramley, A.J., Cullor, J.S., Erskine, R.J., Fox, L.K., Harmon, R.J., Hogan, J.S., Nickerson, S.C., Oliver, S.P., Smith, K.L., Sordillo, L.M. (1996). Current concepts of bovine mastitis, p. 64. 4th Edition, The National Mastitis Council, Madison, WI.

Calvino, L. F. & Tirante, L. (2005). Rev. FAVE Sección Cs. Vet. 4:29-40. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años.

http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/publicaciones/bitstream/1/440/4/fave_vet_v4_n1_2_p29_40.pdf

Calvino, L. F. (2007). CONTROL DE MASTITIS CAUSADAS POR ESTREPTOCOCOS AMBIENTALES. Jornada APROCAL. INTA Rafaela.

<http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/CALVINHO-Jornada-APROCAL-INTA-JULIO-07.pdf>

Calvinho, L. F. (2010). TERAPIA ANTIBIÓTICA PARA VACA SECA: REVISIÓN 2010. Jornada APROCAL. E.E.A. INTA, Rafaela.

<http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/Terapia-Vaca-Seca-Revision-Calvinho-2010.pdf>

Calzolari, A., Giraud, J., Rampone, H., Odierno, L., Giraud, A., Frigerio, C., Bettera, S., Raspanti, C., Hernández, J., Wehbe, M., Mattea, M., Ferrari, M., Larriestra, A., Nagel, R. (1997). Field trials in Argentina of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two dairy herds. *J Dairy Sci*, 80:854-858.

De Graves, F.J., Fetrow, J. (1993). Economics of mastitis and mastitis control. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 9:421-434.

Fitzgerald, G.F., Gasson, M.J. (1988). In vivo gene transfer systems and transposons. *Biochimie* 70:489–502.

Giraud, J., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraud, A., Bogni, C., Larriestra, A., Nagel, R. (1997). Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J Dairy Sci.* 80(5):845-53.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli with plasmids*. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.

Jayarao, B.M., Oliver, S.P., Tagg, J.R., Matthews, K.R. (1991). Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions. *Epidemiol. Infect.* 107,543–555.

Jayarao, B., Doré, J., 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):2235-40.

Johnsen, L.B., Poulsen, K., Kilian, M., Petersen, T.E. (1999). Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect.Immun.* 67,1072–1078.

- Khan, I.U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M.** (2003). Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J Vet Sci* 4: 213–223.
- Lasagno, M.C., Reinoso, E.B., Dieser, S.A., Calvinho, L.F., Buzzola, F., Vissio C., Bogni, C.I., Odierno L.M.** (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in argentinean dairy farms. *Rev. Arg. Microbiol.* 43:212-217.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G., Leenhouts, K.** (1995). A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.* 177:7011–7018.
- Leenhouts, K.J, Kok, J., Venema, G.** (1991). Lactococcal plasmid pWV01 as an integration vector for lactococci. *Appl Environ Microbiol.* 57:2562-2567.
- Leenhouts, K.J., Venema, G.** (1993). Lactococcal plasmid vectors. In: Hardy KG (ed), *Plasmids. A practical approach*, 2nd edn, pp 65–94. New York: Oxford University Press.
- Leenhouts, K., Buist, G., Bolhuis, A., Ten Berge, A., Kiel, J., Mierau, I., Dabrowska, M., Venema, G., Kok, J.** (1996). A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* 253:217–224.
- Leenhouts, K., Venema, G., and Kok, J.** (1998). A lactococcal pWV01-based integration toolbox for bacteria. *Methods Cell Sci.* 20:35–50.
- Leigh, J.A.** (1993). Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 114,67-72.
- Leigh, J.A.** (1994). Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 118,153-158.
- Leigh, J.A., Lincoln, R.A.** (1997). *Streptococcus uberis* acquires plasmin activity following growth in the presence of bovine plasminogen through the action of its specific plasminogen activator. *FEMS Microbiol. Lett.* 154,123-129.

- Leigh, J.A., Finch, J.M., Field, T.R., Real, N.C., Winter, A., Walton, A.W., Hodgkinson, S.M.** (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.** (2003). Exploiting the genome in the control of *Streptococcus uberis*. Proceedings of the British Mastitis Conference. Garstang. 15-22.
- Leigh, J.A., Ward, P.N., Field, T.R.** (2004). The exploitation of the genome in the search for determinants of virulence in *Streptococcus uberis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100, 145–149.
- Lincoln, R.A., Leigh, J.A.** (1998). Characterisation of the interaction of bovine plasmin with *Streptococcus uberis*. *J. Appl. Microbiol.* 84:1104–1110.
- Luther, D.A., Almeida, R.A., Oliver, S.P.** (2008). Elucidation of the DNA sequence of *Streptococcus uberis* adhesion molecule gene (*sua*) and detection of *sua* in strains of *Streptococcus uberis* isolated from geographically diverse locations. *Vet.Microbiol.* 128,304–312.
- Maguin, E.P., Duwat, T.H., Ehrlich, S.D., Gruss, A.** (1992). New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174:5633–5638.
- Maguin, E., Prévot, H., Ehrlich, S.D., Gruss, A.** (1996). Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178:931–935.
- Odierno L, Traversa P, Calvino L, Lasagno M, Bogni C, Reinoso E.** (2006). “Conventional Identification of *Streptococcus uberis* Isolated from Bovine Mastitis in Argentinean Dairy Herds.” *J. Dairy Sci.* 89(10): 3886-90.
- Oliver, S.P., Luther, D.A., Park, H.M., Almeida, R.A.** (2004). SUAM: An important virulence factor in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. In: *Proc. Natl. Mastitis Council.* pp.353–354.
- Patel, D., Almeida, R.A., Dunlap, J.R., Oliver, S.P.** (2009). Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 137, 297–301.

Paulón, M. (2012).

<http://www.prensa.argentina.ar/2012/03/27/29295-agricultura-encabezo-una-reunion-del-consejo-federal-lechero.php>.

Prado, M.E., Almeida, R.A., Ozen, C., Luther, D.A., Lewis, M.J., Headrick, S.I., Oliver, S.P. (2011). Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule induces antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141(3-4):201-208.

Reinoso, E., Magnano, G., Giraud, J., Calzolari, A., Bogni, C. (2002). “Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant RC122.” *Can J Vet Res.* 66(4):285-8.

Reinoso, E., Lasagno, M., Odierno, L. (2005). Identification of *Streptococcus sp.* and *Enterococcus* species isolated from bovine mastitis in Argentina by RFLP. *Biocell.* 29: 172. ISSN 0327-9545 (print). ISSN 1667-5746 (electronic).

Reinoso, E., Lasagno, M., Dieser, S., Odierno, L. (2011). Distribution of virulence associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis, *FEMS Microbiol Lett* 318. 183–188.

Reinoso, E., Lasagno, M., Balmaceda R., Odierno, L. (2013). Genetic patterns of *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine subclinical mastitis and their relationship with virulence profiles. Trabajo enviado a publicar a *Canadian Journal of Microbiology*.

Reneau, J., Packard, V. (1991). Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dairy, Food, Environ. Sanit.* 11:4–11.

Rosey, E.L., Lincoln, R.A., Ward, P.N., Yancey, J., Leigh, J.A. (1999). PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 27–33.

Ruegg, P., DVM, MPVM. (2005). Evaluating the Effectiveness of Mastitis Vaccines. University of Wisconsin – Madison.

<http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/evaluating-the-effectiveness-of-mastitis-vaccines.pdf>

Sambrook, J., Fritsch, E.F, Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Smith, K.L., Oliver, S.P. (1981). Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 137, 535–554.

Ward, P.N., Leigh, J.A. (2002). Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *J. Bacteriol.* 184:119–125.

Ward, P., Field, T., Rapier, C., 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.L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16:41-66.

Yancey, R.J. (2008). Vaccines for Mastitis Control Mastitis Council– Italy February. <http://www.mastitalia.org/mastitalia/documents/Yancey.pdf>