



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

“Los *biofilm* microbianos como factores de virulencia en infecciones intramamarias por *Staphylococcus coagulasa* negativos: estudio de nuevas estrategias de inmuno-intervención”

Mgtr. MV. Agustín Conesa

DIRECTORA: Dra. Carina Porporatto

CODIRECTORA: Dra. Claudia Gabriela Raspanti

Río Cuarto, Julio 2020

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido

Lugar de Trabajo.....

Firma.....

Aclaración.....

Nombre y Apellido

Lugar de Trabajo.....

Firma.....

Aclaración.....

Nombre y Apellido

Lugar de Trabajo.....

Firma.....

Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha

Calificación.....

..Q

*ue Otros se Jacten de las Páginas
que han Escrito; a Mí me
Enorgullecen las que he Leído...*

J.L. Borges

A mis 3 estrellas

Agradecimientos

A mi familia que me apoya en cada paso en la vida, los de sangre desde y para siempre mi amor eterno, mis padres Cristina y Alejandro, mis hermanos Jimena y Alejandro, mi cuñada Natalia, mis sobrinos Tomas, Maitena, Paula y Mateo, y mis 6 abuelos, en especial mis 3 abuelas maternas a quienes dedico este trabajo, a mi amado Lucio, fiel compañero en todo, a mi tia Monica y mi prima Eugenia; y los de corazón que llegaron para quedarse, en especial mis abuelos madrileños Carlos, Juan y Marisa, los villarrosarinos Blanca y José, todos son mi sostén mas grande.

A mis directoras, Carina y Claudia, por su enorme paciencia, y por enseñarme que siempre se puede un poco más, además de sus enormes aportes académicos; a Adriana, Walter y Patricia, por asesorarme a lo largo de este trabajo y ser mi jurado de tesis, gracias por cada aporte.

A la UNVM, mi segundo hogar desde 2007, y la UNRC por darme el lugar y la posibilidad; a CONICET por la beca otorgada.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Mariana, Paola, Cecilia, y Romina, mi apoyo y lugar seguro, y a mis compañeras de grupo y mesada, por todos los aportes y experiencias compartidas; a mi grupo de la UNRC por el apoyo constante.

Al grupo de estancia Yucat, por la posibilidad y la ayuda, en especial a Nato, por hacer de esta experiencia algo mágico y hacerme disfrutar el trabajo diario.

A mis amigos, Guillermo, Noelia y Ailén, mis incondicionales compañeros, a Florencia, que vivio cada batalla y victoria a mi lado como propia.

A Mario, por darme el ultimo empujón y por su ayuda y apoyo incondicional.

Los AMO con sinceridad.

A Todos, Gracias!!!!

ÍNDICE GENERAL

Índice de tablas _____	VII
Índice de figuras _____	IX
Abreviaturas _____	XII
Resumen _____	XIV
Abstract _____	XV

CAPITULO I- Introducción General

I.1. INTRODUCCIÓN _____	2
I.1.1. Mastitis bovina _____	2
I.1.1.1. Generalidades. _____	2
I.1.1.2. Impacto económico _____	3
I.1.1.3. Agentes etiológicos _____	5
I.1.1.3.1. Microorganismos contagiosos _____	5
I.1.1.3.2. Microorganismos ambientales _____	6
I.1.1.3.3. Microorganismos oportunistas _____	6
I.1.1.3.4. Otros microorganismos _____	7
I.1.2. Importancia de los <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos en la mastitis bovina _____	7
I.1.3. Factores de patogenicidad de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos _____	8
I.1.4. Mecanismos de respuesta inmune de la glándula mamaria bovina. _____	9
I.1.4.1. Reconocimiento del patógeno _____	9
I.1.4.2. Citoquinas pro-inflamatorias _____	10
I.1.5. Prevención de mastitis por <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos. _____	11
I.1.5.1. Vacunas e inducción de respuesta _____	11
I.1.6. Polímero Quitosano (Q) _____	12
I.1.7. Antecedentes en el tema _____	14
I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO _____	16
I.3. OBJETIVOS _____	17
I.3.1. OBJETIVO GENERAL _____	17
I.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	17

CAPITULO II- Identificación a nivel de especie de los *Staphylococcus coagulasa* negativos

II.1. INTRODUCCIÓN	19
II.1.1. Identificación bacteriana en el laboratorio	19
II.1.1.1. Métodos fenotípicos	19
II.1.1.2. Métodos moleculares	20
II.2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
II.2.1. Cepas Bacterianas	22
II.2.2. Medios de cultivo	22
II.2.3. Reactivos, enzimas y soluciones stock	22
II.2.3.1. Extracción de ADN cromosomal	23
II.2.3.2. Amplificación de ADN	23
II.2.3.3. Digestión de los productos del ADN amplificado	24
II.2.3.4. Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa	24
II.2.4. Instrumentos y descartables	24
II.2.5. Condiciones generales de cultivo	25
II.2.5.1. Conservación de las cepas	25
II.2.6. Identificación a nivel de especie de SCN	25
II.2.6.1. Pruebas bioquímicas confirmatorias	25
II.2.6.2. Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD)	26
II.2.6.3. Técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción del producto de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del gen conservado <i>gap</i> (PCR-RFLP del gen <i>gap</i>)	26
II.2.6.3.1. Extracción de ADN cromosomal	26
II.2.6.3.2. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa	27
II.2.6.3.3. Digestión enzimática de los productos obtenidos de la PCR	28
II.2.6.3.4. Electroforesis en gel de agarosa	28
II.2.6.3.5. Análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción del gen <i>gap</i>	28
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
II.3.1. Identificación bioquímica	29
II.3.2. Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD)	29

II.3.3. Identificación a nivel de especie de <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos: PCR-RFLP del gen <i>gap</i> _____	30
II.3.4. Comparación del método molecular PCR-RFLP del gen <i>gap</i> con dos metodologías para la identificación de especies de SCN aisladas de leches bovinas_____	32
II.4. CONCLUSIONES PARCIALES _____	35

CAPITULO III- Factores de patogenicidad de *Staphylococcus* coagulasa negativos

III.1. INTRODUCCIÓN_____	37
III.1.1. Producción de <i>biofilm</i> _____	37
III.1.2. Producción de enterotoxinas _____	39
III.1.3. Resistencia antibiótica a β -lactámicos _____	41
III.1.4. Proteínas de superficie. Adherencia e internalización _____	43
III.2. MATERIALES Y MÉTODOS _____	45
III.2.1. Cepas bacterianas _____	45
III.2.2. Medios de cultivo _____	46
III.2.3. Reactivos, enzimas y soluciones stock_____	46
III.2.3.1. Tinción de <i>biofilm</i> con cristal violeta _____	46
III.2.3.2. Extracción de ADN cromosomal_____	46
III.2.3.3. Amplificación de ADN por PCR_____	47
III.2.3.4. Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa _____	52
III.2.3.4. Adherencia, internalización y sobrevida _____	52
III.2.4. Instrumentos y descartables _____	52
III.2.5. Condiciones generales de cultivo _____	53
III.2.5.1. Conservación de las cepas_____	53
III.2.6. Evaluación de la capacidad de formación de <i>biofilm</i> (método cuantitativo) _____	53
III.2.7. Amplificación por PCR de productos relacionados a genes de adherencia y formación de <i>biofilm</i> , producción de enterotoxinas y resistencia a β -lactámicos_____	55
III.2.7.1. Extracción de ADN cromosomal_____	55
III.2.7.2. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa_____	56
III.2.7.3. Electroforesis en gel de agarosa _____	56

III.2.8. Adherencia/Internalización y supervivencia en la línea celular MAC-T _____	57
III.2.8.1. Conservación y mantenimiento de la línea celular durante el periodo de ensayo _____	57
III.2.8.2. Ensayo de adherencia, internalización y sobrevivencia de SCN en MAC-T _____	57
III.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	60
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	61
III.3.1. Formación de <i>biofilm</i> : evaluación de la capacidad fenotípica de forma cuantitativa _____	61
III.3.2. Evaluación de la presencia de productos de amplificación atribuidos a genes relacionados a los principales factores de virulencia de SCN _____	64
III.3.2.1. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a genes de adherencia y formación de <i>biofilm</i> _____	64
III.3.2.2. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a genes que codifican para las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (<i>sea-see</i>) _____	66
III.3.2.2.1. Asociación entre la presencia de productos de amplificación relacionados a genes de enterotoxinas y el crecimiento bacteriano en <i>biofilm</i> _____	69
III.3.2.3. Determinación de perfiles genéticos de resistencia a β -Lactámicos _____	71
III.3.3. Adherencia, internalización y supervivencia en la línea celular MAC-T _____	75
III.3.3.1. Asociación entre la capacidad de adherencia, internalización y supervivencia de SCN en la línea celular MAC-T y el crecimiento bacteriano en <i>biofilm</i> _____	76
III.4. CONCLUSIONES PARCIALES _____	79
CAPITULO IV - Mecanismos de respuesta inmune de la glándula mamaria bovina	
IV.1. INTRODUCCION _____	81
IV.1.1. Prevención de mastitis por <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos _____	81
IV.1.2. <i>Biofilm</i> de SCN _____	82

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS _____	84
IV.2.1. Cepas bacterianas _____	84
IV.2.2. Medios de cultivo _____	84
IV.2.3. Reactivos, enzimas y soluciones stock _____	84
IV.2.3.1. Respuesta inmune _____	85
IV.2.3.1.1. Inmunoensayo enzimático _____	85
IV.2.3.2. Caracterización de la composición de <i>biofilm</i> _____	85
IV.2.3.3. Ensayo <i>in vivo</i> _____	85
IV.2.4. Instrumentos y descartables _____	85
IV.2.5. Condiciones generales de cultivo _____	86
IV.2.5.1. Conservación de las cepas _____	86
IV.2.6. Evaluación de la respuesta inmune _____	86
IV.2.6.1. Ensayo inmuno-enzimático (ELISA) _____	86
IV.2.7. Caracterización de la composición de <i>biofilm</i> _____	87
IV.2.8. Evaluación de la respuesta inmune de la cepa elegida en diferentes tiempos y fracciones _____	88
IV.2.9. Ensayo <i>in vivo</i> _____	89
IV.2.9.1. Animales _____	89
IV.2.9.2. Inmunización con de la matriz del <i>biofilm</i> proteico. Preparación del inmunógeno _____	89
IV.2.9.3. Prueba de Reacción al producto _____	90
IV.2.9.4. Esquema de inmunización y muestreo _____	91
IV.2.9.5. Determinaciones analíticas _____	92
IV.2.9.5.1. Análisis bacteriológico y recuento de células somáticas _____	92
IV.2.9.5.2. Determinación de anticuerpos _____	93
IV.2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	94
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	95
IV.3.1. Evaluación de la respuesta inmune de células epiteliales MAC- T frente a infección experimental con SCN mediante medición de IL- 1 β e IL-6 por inmunoensayo enzimático _____	95
IV.3.2. Evaluación de la respuesta inmune de la cepa elegida en diferentes tiempos y fracciones _____	98
IV.3.3. Caracterización de la composición de <i>biofilm</i> _____	99
IV.3.4. Ensayo <i>in vivo</i> _____	104

IV.3.4.1. Prueba de Reacción al producto _____	105
IV.3.4.2. Determinación de anticuerpos _____	105
IV.3.4.2.1. Determinación de anticuerpos – Suero _____	105
IV.3.4.2.2. Determinación de anticuerpos – Calostro _____	109
IV.3.4.2.3. Determinación de anticuerpos – Leche _____	112
IV.3.4.2. Análisis bacteriológico y Recuento de Células Somáticas _____	116
IV.4. CONCLUSIONES PARCIALES _____	119
CONCLUSIONES FINALES _____	120
BIBLIOGRAFÍA _____	124
ANEXO _____	167

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de especies de 118 SCN aislados a partir de leche bovina usando PCR-RFLP del gen <i>gap</i>	33
Tabla 2. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes de adherencia, <i>biofilm</i> (<i>bap</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbpA</i> , <i>fnbpB</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> , <i>aap</i> , <i>fbe</i> , <i>embP</i>).	48
Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes de adherencia, <i>biofilm</i> (<i>altE</i> , <i>eno</i> , <i>cna</i>).	48
Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación de los genes de adherencia, <i>biofilm</i> y enterotoxinas clásicas (<i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , <i>see</i>).	49
Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>blaZ</i>	49
Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>mecA</i>	50
Tabla 7. Secuencia de cebadores utilizados y tamaño de amplicón	50
Tabla 8. Secuencia de cebadores utilizados y tamaño de amplicón	51
Tabla 9. Clasificación cuantitativa de la capacidad para formar <i>biofilm</i> adaptada a los valores en estudio	55
Tabla 10. Distribución de la producción de <i>biofilm</i> entre especies de SCN	61
Tabla 11. Detección de genes asociados a adherencia y <i>biofilm</i> en cepas de SCN con diferente capacidad para formar <i>biofilm</i>	65

Tabla 12. Detección por PCR de genes que codifican para enterotoxinas estafilococales (Ses) en cepas de <i>S. chromogenes</i> , <i>S. xylosus</i> y <i>S. haemolyticus</i> _____	68
Tabla 13. Detección por PCR de genes que codifican para enterotoxinas estafilococales (SEs) en cepas de <i>S. chromogenes</i> , <i>S. xylosus</i> y <i>S. haemolyticus</i> formadoras de <i>biofilm</i> (I y F) _____	69
Tabla 14. Detección por PCR de genes que codifican para enterotoxinas estafilococales (SEs) en cepas de <i>S. chromogenes</i> , <i>S. xylosus</i> y <i>S. haemolyticus</i> no formadoras de <i>biofilm</i> y formadoras de <i>biofilm</i> (D) _____	70
Tabla 15. Detección de genotipos <i>blaZ</i> y <i>mecA</i> en cepas de SCN resistentes a β -lactámicos, con diferente capacidad para formar <i>biofilm</i> _____	73
Tabla 16. Porcentaje de desprendimiento de <i>biofilm</i> de las cepas SCN en estudio _____	100
Tabla 17. Frecuencias absolutas de infección por <i>Staphylococcus</i> spp. y grupo de tratamiento _____	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos. _____	3
Figura 2. Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeana _____	4
Figura 3. Quitosano: co-polímero compuesto por unidades de β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-D-glucosa y β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-D-glucosa. _____	13
Figura 4. a) Tinción de Gram (+), b) prueba de catalasa, c) prueba de coagulasa. _____	29
Figura 5. Crecimiento de las cepas aisladas en medio selectivo y diferencial CHROMagar. _____	30
Figura 6. Patrón electroforético del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR del gen <i>gap</i> a partir de las seis cepas de referencia, luego de la digestión con la enzima de restricción <i>AluI</i> _____	31
Figura 7. Prevalencia de las diferentes especies de SCN del total de aislamientos. _____	34
Figura 8. Etapas en el proceso de formación del <i>biofilm</i> _____	38
Figura 9. Porcentaje de cepas de las principales especies de SCN según la capacidad de formar <i>biofilm</i> _____	62
Figura 10. Fuerza del <i>biofilm</i> para las especies más prevalentes _____	63
Figura 11. Detección por PCR de los genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> y <i>see</i> , en cepas de referencia. _____	67

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de 517 pb del gen <i>blaZ</i> en cepas de SCN. _____	71
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de 533 pb del gen <i>mecA</i> en cepas de SCN. _____	72
Figura 14. Capacidad de Adherencia, Internalización y Sobrevida para las especies <i>S. chromogenes</i> (S.ch), <i>S. xylosus</i> (S.xy) y <i>S. haemolyticus</i> (S.h). _____	75
Figura 15. Capacidad de Adherencia, Internalización y Sobrevida según la capacidad de formación de <i>biofilm</i> . _____	77
Figura 16. Capacidad de Adherencia, Internalización y Sobrevida para las especies <i>S. chromogenes</i> (S.ch), <i>S. xylosus</i> (S.xy) y <i>S. haemolyticus</i> (S.h), según capacidad de formación de <i>biofilm</i> . _____	78
Figura 17. Esquema de preparación de los Inmunógeno. _____	90
Figura 18. Esquema de Prueba de reacción al producto. _____	91
Figura 19. Esquema de Inoculación, observación clínica y muestreo de sangre, calostro y leche en función de la fecha probable de parto. _____	92
Figura 20. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 en sobrenadante de cultivo celular MAC-T estimulados con diferentes aislamientos de SCN según su capacidad de formar <i>biofilm</i> _____	96
Figura 21. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 en sobrenadante de cultivo celular MAC-T estimulados con diferentes aislamientos de SCN _____	96

Figura 22. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 en sobrenadante de cultivo celular MAC-T estimulados con diferentes aislamientos de SCN	97
Figura 23. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 en sobrenadante de cultivo celular MAC-T	99
Figura 24. Porcentaje de disrupción de <i>biofilm</i> maduros de las cepas de SCN	102
Figura 25. Porcentaje de disrupción de <i>biofilm</i> maduros de las cepas de SCN	103
Figura 26. Niveles de IgG específica en suero	107
Figura 27. Niveles de IgG1 específica en suero	108
Figura 28. Niveles de IgG2 específica en suero	108
Figura 29. IgG en calostro.	110
Figura 30. IgG1 en calostro	111
Figura 31. IgG2 en calostro	111
Figura 32. IgG en leche	113
Figura 33. IgG1 en leche	113
Figura 34. IgG2 en leche	114

LISTA DE ABREVIATURAS

Aap	Proteína asociada a la acumulación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ATCC	American Type Culture Collection
Bap	Proteína asociada a la formación de <i>biofilm</i>
cel./mL	Células por mililitro
CFB	Capacidad de formación de <i>biofilm</i>
CifA y CifB	Factor de Aglutinación
CV	Cristal violeta
D	Débil
dNTPs	Deoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DOc	Densidad óptica de corte
ELISA	Inmunoensayo enzimático
Embp	Proteínas de unión a la matriz extracelular
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
F	Fuerte
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fbe	Proteínas de adhesión a fibrinógeno
FnbpA y FnbpB	Proteínas de unión a fibronectina
GM	Glándula mamaria
I	Intermedio
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IIM	Infecciones intramamarias
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MAC-T	Línea celular comercial de alveolo mamario bovino

MB	Mastitis bovina
NF	No formadora
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIA	Polisacárido de adhesión intercelular
PNAG	Poly-N-acetil glucosamina
RCS	Recuento de Células Somáticas
RFLP	Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
SaPIs	Islas de patogenicidad
SCN	Staphylococcus coagulasa negativos
SDS	Sodio dodecil sulfato
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
SEA	Enterotoxina estafilocócica tipo A
SEB	Enterotoxina estafilocócica tipo B
SEC	Enterotoxina estafilocócica tipo C
SED	Enterotoxina estafilocócica tipo D
SEE	Enterotoxina estafilocócica tipo E
SET	EDTA-tris-cloruro de sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA
TSA	Agar tripticasa soya
TSB	Caldo Tripticasa Soya
ufc/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro

RESUMEN

Staphylococcus coagulasa negativos (SCN) son los microorganismos más frecuentemente aislados de infecciones intramamarias en bovinos, tanto en Argentina como en numerosas partes del mundo. Su patogenicidad está asociada con la presencia de distintos factores de virulencia, entre ellos, la formación de biopelícula (*biofilm*), que les confiere la capacidad de adhesión a superficies vivas o inertes y protección frente al sistema inmune como ante los agentes antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue obtener un inmunógeno basado en componentes de la matriz del *biofilm* de una cepa SCN aislada de mastitis bovina, asociado a quitosano (Q) o a Hidróxido de Aluminio como adyuvantes. Para ello se identificaron por PCR-RFLP del gen *gap* 133 aislados de SCN obtenidos a partir de muestras de leche bovinas de tambos de la cuenca lechera de Villa María, una de las zonas productivas más importante a nivel nacional. Entre las especies más prevalentes, *S. xylosus* resultó ser la especie con mayor capacidad de formación de *biofilm* (CFB). La presencia de algún gen o combinación de genes relacionados a formación de *biofilm* y adherencia celular no mostró relación con la capacidad de formar *biofilm* lo que indicaría que este tipo de crecimiento es un proceso multifactorial que depende de numerosas variables. Las bacterias que presentaron una menor CFB mostraron una capacidad de internalización celular significativamente mayor, sugiriendo que aquellas cepas que tiene la capacidad de invadir no necesitan la formación de *biofilm* para sobrevivir en el huésped. Durante la infección experimental de MAC-T con SCN, las células epiteliales mamarias presentaron la capacidad de inducir una respuesta inmune innata mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL1 β . La inmunización de 40 vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación con el precipitado concentrado de la matriz de *biofilm* combinado con adyuvantes, de una cepa de *S. xylosus* que indujo una exacerbada respuesta inmune *in vitro*, estimuló la formación de anticuerpos séricos contra los componentes del *biofilm*. Los niveles de anticuerpos obtenidos cuando los animales fueron inoculados con el adyuvante Q fueron mayores a aquellos cuando el adyuvante fue Hidróxido de Aluminio. Los resultados obtenidos permiten concluir que se obtuvo un inmunógeno prototípico con una probada actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, para generar una respuesta inmune a partir de la matriz de *biofilm*, por ende, se postula a este como un potencial candidato para el desarrollo de estrategias vacunales futuras.

ABSTRACT

Coagulase negative *Staphylococci* (CNS) are the most frequently isolated microorganisms from bovine intramammary infections in Argentina as in many parts of the world. Their pathogenicity is associated with the presence of different virulence factors, among them, *biofilm* formation, which gives them the ability to adhere to living or inert surfaces and to avoid the immune system as well as antimicrobial agents. The objective of this work was to obtain an immunogen based on *biofilm* matrix components of an CNS strain isolated from bovine mastitis, associated with chitosan (Q) or aluminum hydroxide as adjuvants. To do this, 133 isolates of CNS from bovine milk samples from dairy farms in the Villa María dairy basin, one of the most important production areas nationwide, were obtained by PCR-RFLP of the *gap* gene. Among the most prevalent species, *S. xylosus*, turned out to be the species with the highest *biofilm* formation capacity (BFC). The presence of any gene or combination of genes related to *biofilm* formation and cell adherence showed no relationship with the ability to form *biofilm*, which would indicate that this type of growth is a multifactorial process that depends on a large number of variables. Bacteria with the lowest BFC showed significantly greater cell internalization capacity, suggesting that those strains that have the ability to invade do not need *biofilm* formation to survive in the host. During experimental MAC-T infection with CNS, mammary epithelial cells exhibited strong innate immune defense capabilities through secretion of proinflammatory cytokines (IL-6 and IL1 β). *In vivo* immunization of 40 pregnant Holstein heifers in the last trimester of gestation with the concentrated pellet of the *biofilm* matrix combined with adjuvant, from one of the *S. xylosus* strain that had shown an exacerbated immune response *in vitro*, stimulated the formation of serum antibodies against the *biofilm* components. The antibody levels obtained when the animals were inoculated with the Q adjuvant were higher than those obtained when the adjuvant was aluminum hydroxide. The results obtained allow us to conclude that a prototypic immunogen with a proven *in vitro* and *in vivo* activity was obtained to generate a response from a *biofilm* matrix; therefore, it is postulated as a potential candidate for the development of future vaccine strategies.

Introducción

General



I.1. INTRODUCCIÓN

I.1.1. Mastitis bovina

I.1.1.1. Generalidades.

La mastitis bovina (MB) es una inflamación de la glándula mamaria (GM) asociada al parto y la lactancia, y constituye la patología más frecuente que afecta al ganado bovino lechero [De Vlieghe y col., 2012]. La producción lechera es una de las actividades económicas más importantes del país, en Córdoba funcionan 2.800 tambos, que representan el 34% de los establecimientos de la Argentina y producen 3.500 millones de litros anuales, siendo esta la provincia que mayor cantidad de leche produce [ABC Rural, 2019]. En los últimos años ha incrementado la demanda de leche y ha disminuido el número de tambos, esto ha llevado a una mayor explotación del rodeo y de la infraestructura del tambo con consecuencias sanitarias indeseadas; la MB es causada principalmente por microorganismos y se caracteriza por el cese en el suministro de leche, alteraciones en la calidad y en la producción láctea [Ashraf e Imran, 2020]. De acuerdo con el recuento de células somáticas (RCS) en leche, el nivel de la infección intramamaria (IIM) y el estadio de la lactancia en el que se produce la infección, la MB puede aparejar serios problemas en el ganado vacuno lechero, con grandes pérdidas económicas no solo por el descarte de la leche y de las vacas infectadas en casos severos, sino también por el costo de los tratamientos utilizados para controlar y erradicar la patología [Hogeveen y col., 2011; Rollina y col., 2015].

La enfermedad puede cursar como subclínica, que es la de mayor prevalencia en un rodeo, sin signos clínicos evidentes en el animal y apariencia normal de la leche con RCS superior a 200.000 cel/mL, o como clínica, con alteraciones macroscópicas de la leche y síntomas palpables de la ubre [Philpot y Nickerson, 1992]. En la mastitis clínica se pueden presentar signos sistémicos los cuales pueden culminar en bacteriemia, septicemia y muerte del animal [Philpot y Nickerson, 1992; Leigh, 2002].

Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad poli factorial”, porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla, de la patogenicidad y cantidad de bacterias presentes en el rodeo y de las condiciones del medio ambiente, en particular del manejo del ordeño que se esté desarrollando en el establecimiento (Figura 1) [Andresen, 2001].

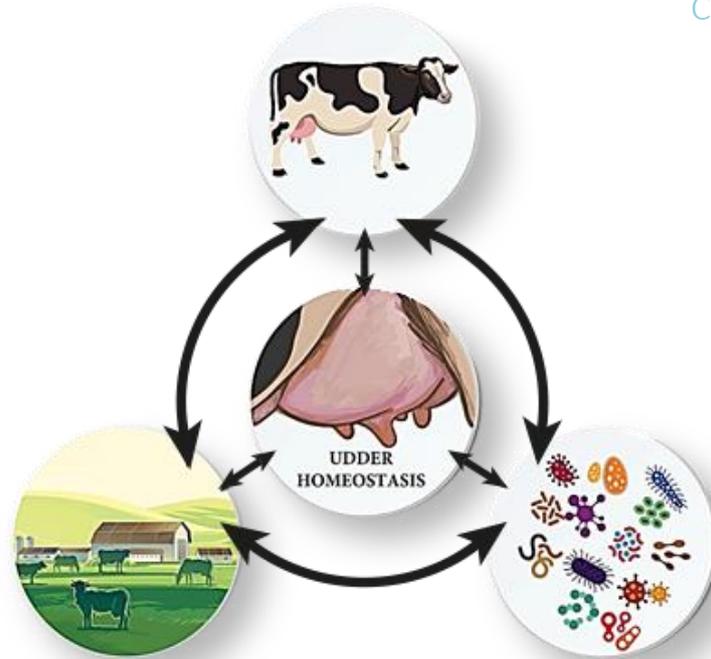


Figura 1. Interacción de los factores que participan en la transmisión de la mastitis: vaca, medio ambiente y microorganismos. Adaptado de Derakhshani y col., 2018.

I.1.1.2. Impacto económico

A nivel mundial, las pérdidas causadas por MB son millonarias, y representan el 70 % de los gastos totales para los ganaderos lecheros [Philpot y Nickerson, 1992; dos Santos y col., 2002; Wellenberg y col., 2002; De Vliegher y col., 2012; Fabres-Klein y col., 2014; Rollin y col., 2015]. El impacto económico directo de valores elevados de RCS difiere considerablemente entre países, y depende de la violación de límites para leche de calidad reducida o de premios pagados por leche de alta calidad. En nuestro país la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Agroindustria estableció para la “Leche de Referencia”, en el sistema de pago de leche cruda, recuentos <math><400.000\text{ cel./mL}</math> para el mayor porcentaje de bonificación por calidad higiénico-sanitarios [SECAGYP, 2017].

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina [MAGyP, 2015], los valores de RCS en leche, en un total de 6.229 tambos con una producción promedio mensual de aproximadamente 557 millones de litros de leche en enero del 2015, fue de 446.400 cel/mL. Teniendo en cuenta que las pérdidas económicas corresponden al 5% del total de la leche producida se puede calcular una disminución anual aproximada de 334 millones de litros.

La producción lechera en Argentina tiene lugar principalmente en la región pampeana, abarcando el noreste de la Pampa, centro oeste de la Provincia de Santa Fe, el Sudeste de la provincia de Córdoba, el Norte, Oeste y Sur de la provincia de Buenos Aires, Sur de la provincia de Santiago del Estero y centro sur de la provincia de Entre Ríos, con aproximadamente 10.000 tambos [Lechería Argentina, Anuario 2014], (Figura 2).



Figura 2. Cuencas Lecheras Pampeanas y Extra-Pampeana [Adaptado de Marino y col., 2011].

En un estudio sobre 48 establecimientos lecheros pertenecientes a la Unidad Ejecutora Local de Villa María, Córdoba, Argentina, Vissio y col (2015) analizaron un promedio de 128 vacas en ordeño por establecimiento (rango 70-212). Los datos obtenidos mostraron que la mediana de pérdidas en producción de leche por mastitis subclínica fue de 2,8 litros/vacas/día lo que representa un costo de US\$ 0,99/vaca/día. Por otro lado, la mediana de pérdidas en producción de leche atribuidas a mastitis clínica fue de 0,12 litros/vaca/día, lo que representó un costo de US\$ 0,04/vaca/día. El mismo grupo de investigación en estudios previos en la misma cuenca lechera [Larriesta y Vissio, 2012], encontraron una prevalencia global de mastitis subclínica del 19,4% y de mastitis clínica del 3% en un total de 2000 vacas. Estos resultados demuestran las grandes pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis clínica y subclínica.

A pesar de que existen tratamientos para la MB, el éxito de los mismos es decepcionante y depende de la vaca, el agente patógeno y el tratamiento [Keefe, 2012].

La patogénesis y la epidemiología de la enfermedad siguen siendo en gran medida desconocidas, y otros factores de riesgo específicos de patógenos deben ser identificados para optimizar los programas de prevención actuales.

I.1.1.3. Agentes etiológicos

La MB es principalmente una enfermedad infecciosa de la GM, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, hongos, y hasta algunos virus [Pereyra y col., 2014]. Las especies de los géneros bacterianos *Staphylococcus* y *Streptococcus* son las más prevalentes en infecciones clínicas y subclínicas en Argentina [González y col., 1980; Calvino y col., 1991; Rivero y col., 1994; Gentillini y col. 2002; Calvino y Tirante 2005; Dieser y col., 2014; Srednik y col., 2019; Lasagno y col., 2019]. De acuerdo a su hábitat, interacción con el huésped y patogenicidad, los microorganismos pueden ser clasificados como: microorganismos contagiosos, ambientales, oportunistas y otros [Watts y Owen, 1989; Philpot y Nickerson, 1992; National Mastitis Council, 2009].

I.1.1.3.1. Microorganismos contagiosos

Los patógenos contagiosos viven y se multiplican sobre y dentro de la GM infectada, además se propagan entre cuartos de un mismo animal o de un animal a otro, principalmente durante procedimientos de ordeño poco higiénicos [Zadoks y col., 2001; Rossitto y col., 2002].

Si bien las especies más frecuentemente aisladas dentro de este grupo incluyen a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, también se señala a *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis* y *Streptococcus dysgalactiae* como agentes causales de MB [Philpot y Nickerson, 1992]. *Mycoplasma* puede ser considerado un patógeno emergente de mastitis [Fox y col., 2005; Barkema y col., 2009; Passchyn y col., 2011].

Dentro del género *Staphylococcus*, la especie *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de mastitis clínica y subclínica más difícil de controlar en vacas lecheras tanto en Argentina [Calvino y Tirante, 2005; Zecconi y col., 2005; Camussone y Calvino, 2013], como en otros países de gran desarrollo lechero [Kateete y col., 2013; Basanisi y col., 2017; Wang y col., 2018].

Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con RCS elevados y persistencia de la bacteria en la GM [Bardiau y col., 2014].

I.1.1.3.2. Microorganismos ambientales

Los patógenos ambientales se encuentran en el ambiente donde vive la vaca, pasturas, cama, excremento, entre otros, y pasan a la ubre en los períodos entre ordeño [Zadoks y col. 2002]. Dentro de este grupo se encuentran *Streptococcus dysgalactiae* comportándose tanto como un patógeno ambiental como contagioso [Smith y Hogan, 1993; Calvino y Tirante, 2005], *Streptococcus uberis* causando tanto mastitis subclínica y clínica [Compton y col., 2007] y bacterias Gram negativas representadas principalmente por bacterias coliformes [Smith y col., 1985; Oliver, 1988] entre ellas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, y especies de *Citrobacter*, *Serratia* y *Proteus* [Philpot y Nickerson, 1992], los patógenos ambientales también pueden causar problemas de mastitis en el periparto [Fox, 2009].

I.1.1.3.3. Microorganismos oportunistas

Los *Staphylococcus coagulasa negativos* (SCN) se encuentran normalmente colonizando la piel sana de los pezones y en las manos de los ordeñadores, y por esto se encuentran en una posición “oportunista” para colonizar el canal del pezón [Davidson y col., 1992]. Los SCN son la principal causa de mastitis subclínica en la mayoría de los rodeos lecheros con adecuado manejo higiénico-sanitario y control de la mastitis contagiosa [Pyörälä y Taponen, 2009; Bonetto, 2014, Dierker y col., 2014; Calvino y col., 2019]. Estos se han convertido en las bacterias predominantemente encontradas en muestras de leche de vacas en todo el mundo [Makovec y Ruegg, 2003; Pitkälä y col., 2004; Piepers y col., 2007; De Vliegher y col., 2012; Vanderhaeghen y col., 2014; 2015]. La descripción de la patogenicidad de este grupo bacteriano no se encuentra del todo claro, ya que puede causar mastitis clínica como subclínica e incluso algunos autores han informado acerca de un efecto benéfico de estos microorganismos a la ubre, debido a que impide la colonización de patógenos mayores [Nickerson y Boddie, 1994; De

Vliegheer y col., 2003; 2004; Taponen y col., 2007; Schukken y col., 2009].

I.1.1.3.4. Otros microorganismos

Una gran variedad de microorganismos se puede aislar con menor frecuencia de casos de MB e incluyen a los géneros *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Bacillus* y *Pasteurella*. Las infecciones causadas por algunos de ellos casi siempre son debidas a los inadecuados procedimientos de manejo, especialmente cuando se desarrollan las condiciones que pueden incrementar la exposición a los mismos [Philpot y Nickerson, 1992; Hertl y col., 2014, Turni y col., 2016; Savage y col., 2017].

I.1.2. Importancia de los *Staphylococcus* coagulasa negativos en la mastitis bovina

Si bien *S. aureus* es uno de los principales patógenos causantes de MB, el adecuado manejo higiénico-sanitario de los rodeos lecheros, ha llevado a una reducción de la incidencia general de la mastitis contagiosa debida a patógenos mayores, y a que patógenos oportunistas, como los SCN, sean en la actualidad la causa principal de IIM en el ganado bovino a lo largo del mundo [De Vliegheer y col., 2012; El-Jakee y col., 2013; Becker y col., 2020].

Además, este grupo de microorganismos presenta la habilidad de eludir el sistema inmune y persistir en la glándula por un largo periodo de tiempo [Piessens y col., 2011; Supré y col., 2011]. Esto se asocia con un incremento en el nivel de RCS y cambios en el patrón de leucocitosis indicando que los SCN causan una inflamación mamaria crónica similar a la causada por *S. aureus* [Timms y Schultz, 1987; Hogan y col., 1987; Oliver y Jayarao, 1997; Chaffer y col., 1999; Taponen y Pyörälä, 2009; Gillespie y col., 2009; Piepers y col., 2010; Paradis y col., 2010; Tomazi y col., 2015]. Por otro lado, la prevalencia de SCN que albergan genes que codifican toxinas y resistencia a antimicrobianos los ubica como potenciales causantes de esta enfermedad [Zhang y Maddox, 2000; Rall y col., 2010; Oliveira Calsolari y col., 2011; Park y col., 2012].

Dado que los SCN están adquiriendo cada vez mayor participación en las infecciones de los rebaños lecheros y siendo frecuentemente los más aislados [De Vliegheer y col., 2004; Pitkälä y col., 2004; Calvino y Tirante, 2005; Cunha y col., 2006; López Meza,

y col., 2006; Tenhagen y col., 2006; Piepers y col., 2007; Taponen, 2008; Sampimon y col., 2009; Pyörälä y Taponen, 2009; Paradis y col., 2010; Piessens y col., 2010; Waller y col., 2011; Kaliwal y col., 2011; Park y col., 2012], varios estudios han sugerido considerar en la actualidad a estos microorganismos como patógenos emergentes causantes de MB [Pyorala y Taponen, 2009; El-Jakee y col., 2013; Hosseinzadeh y Saei, 2014; Taponen y col., 2015; Nobrega y col., 2018; Pumipuntu y col., 2019; Jenkins y col., 2019].

I.1.3. Factores de patogenicidad de *Staphylococcus coagulasa negativos*

La patogenicidad de las especies de SCN está asociada con la presencia de distintos factores de virulencia. Entre los más importantes se describen: componentes de la pared celular: cápsula de polisacárido y biopelículas, que permiten evadir los mecanismos de defensa del huésped como la fagocitosis; proteínas de superficie: reconocen moléculas adhesivas de la matriz que promueven la adhesión al tejido del huésped, y la posible internalización tal como: proteína de unión a fibrinógeno y proteína de unión a fibronectina; proteínas secretadas como superantígenos; enzimas que degradan tejido del huésped: proteasas, lipasas, hialuronidasas, colagenasas que promueven la invasión y la propagación bacteriana al tejido [Haveri y col., 2007; Fournier y col., 2008; Naushad y col., 2019; Becker y col., 2020]. La conjunción de los distintos factores de virulencia contribuyen a que la bacteria patógena evada las defensas del huésped, facilite su adherencia a las células epiteliales mamarias y colonice el tejido favoreciendo su persistencia y supervivencia, garantizando así el éxito para instalarse y mantenerse en el tejido huésped [Mamo y col., 1988; Saa y Kruze, 1994; Almeida y Oliver, 2001; Anaya-Lopez y col., 2006; Oliveira y col., 2006; Coelho y col., 2011]. Además, la producción de varias toxinas y enzimas que contribuyen a su virulencia inducen respuestas inflamatorias o daño tisular [Janda, 1986; Scheifele y col., 1987; Watts y Owens, 1987; Bedidi-Madani y col., 1998; Zhang y Maddox, 2000; Otto, 2004; Cunha y col., 2006; Türkyilmaz y Kaya, 2006].

I.1.4. Mecanismos de respuesta inmune de la glándula mamaria bovina.

La GM bovina luego del ingreso de agentes patógenos desarrolla diversos mecanismos de defensa que se traducen en una respuesta inmune particular. El estudio de estos factores es de suma importancia para la propuesta de posibles tratamientos y métodos preventivos de la MB. Esta respuesta inmune está mediada por factores innatos y adquiridos asociados a este tejido, que actúan de manera coordinada, siendo su eficiencia el factor determinante de la protección ante nuevas infecciones [Sordillo y col., 2002; Rainard y Riollet, 2006, Schukken, y col. 2011].

Ante el primer contacto del agente invasor con el huésped, actúa la inmunidad innata como primera línea de defensa, siendo determinante para la eliminación del patógeno, o el establecimiento, progresión y gravedad de la infección, como así también para la generación de la respuesta inmune adaptativa [Aitken y col., 2011]. El sistema de defensa innato está constituido por barreras físicas como el esfínter del ápice del pezón, que permanece cerrado por un músculo elástico para así reducir las infecciones ascendentes, el cual está a su vez cubierto por queratina, como barrera química.

Existen también factores solubles como citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, lisozima y lactoferrina. Esta última, actúa como un quelante del hierro, reduciendo su disponibilidad para el desarrollo bacteriano, y los elementos celulares que incluyen además de las propias células del epitelio, que presentan sus mecanismos de defensa, células inmunes como macrófagos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y células NK [Rainard y Riollet, 2006].

El sistema adaptativo está constituido por grupos celulares específicos que reconocen a patógenos particulares, y está mediado por linfocitos T y B. Esta respuesta es más efectiva luego de la exposición al patógeno, ya que mediante la síntesis de anticuerpos y activación secundaria por linfocitos B y T permitiría la eliminación de los agentes causales [Schukken y col. 2011].

I.1.4.1. Reconocimiento del patógeno

Al ingresar un agente patógeno a la GM, éste es percibido por las células del huésped, tanto las epiteliales como las propias del sistema inmune, y éstas a través de receptores propios en su superficie llamados PRR (Pattern Recognition Receptors), expresados por las células epiteliales alveolares y por leucocitos [Strandberg y col., 2005], se unen a sus

moléculas análogas presentes en la bacteria llamados PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

Los más importantes de los PRR son los llamados TLR (Toll-Like Receptors), estructuras proteicas complejas que reconocen los PAMP y responden secretando factores como las citoquinas [Akira y col., 2006]. Se han descrito muchos tipos de TLR, en bovinos se conocen 10 secuencias diferentes [Werling y col., 2006], y dentro de estos, los TLR2 y 4 son los más reactivos en IIM para bacterias Gram positivas y negativas, respectivamente [Takeda y col., 2005]. Al unirse TLR y PAMP se activan factores de transducción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) que induce la producción de citoquinas y otros mediadores de la defensa. Estos receptores juegan un rol importante en la respuesta inmune de la GM frente a infecciones [Yang y col., 2008] y la magnitud y duración de la respuesta de citoquinas en IIM depende del tipo de patógeno actuante [Bannerman y col., 2009]. Esta respuesta es mayor en bacterias Gram negativas y coliformes que expresan lipopolisacáridos (LPS) en su superficie, y menor en Gram positivas como el género *Staphylococcus* que expresan ácido lipoteicoico (LTA), [Wellnitz y col., 2012]. Estas diferencias en la reacción ante las estructuras explican por qué el primer grupo está más relacionado con infecciones agudas con signos clínicos evidentes, mientras que *Staphylococcus* es más propenso a infecciones del tipo crónico y reincidente.

I.1.4.2. Citoquinas pro-inflamatorias

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de proteínas de bajo peso molecular sintetizadas por una alta variedad de células, principalmente células inmunes. Tienen la función de regular la intensidad y duración de la respuesta estimulando o inhibiendo la acción de células de muchos tipos y de otras citoquinas, actuando solas o interactuando entre ellas de manera sinérgica. Las citoquinas más importantes son las interleuquinas (IL), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón-gamma (INF- γ). TNF- α , IL-1 β e IL-6 son las citoquinas pro-inflamatorias predominantes en la circulación en procesos agudos [Riollet y col., 2000]. TNF- α es secretada por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales, es la principal citoquina en los procesos tempranos de la respuesta inmune innata. IL-1 β , es producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas linfocitos, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales. Esta citoquina se induce en respuesta a virus, bacterias, hongos y parásitos, y por otras citoquinas como TNF- α , IL-

6, IL-8 e IL-12. IL-6 presenta un efecto dual, actuando tanto en respuestas anti como pro-inflamatoria, la producen macrófagos, neutrófilos, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales, la inducen bacterias y virus y otras citoquinas como IL-1 β y TNF- α [Pereyra y col., 2014; Piccinini y col., 1999].

I.1.5. Prevención de mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

I.1.5.1. Vacunas e inducción de respuesta

La vacunación es una estrategia común y fácil para el control de enfermedades infecciosas. En los últimos tiempos se realizaron avances significativos en la obtención de antígenos vacunales, mediante técnicas de extracción y purificación de compuestos, y síntesis de proteínas recombinantes, combinados a moléculas transportadoras para generar una respuesta inmune óptima [Gerdt y col., 2013]. La asociación de antígenos a compuestos adyuvantes o inmunoestimulantes, tienen la finalidad de modular en forma eficiente una respuesta inmune apropiada [Reed y col., 2009].

La vacunación representa una de las herramientas más estudiadas y buscadas para prevenir MB [Leitner y col., 2003; Pujato, 2015]. Sin embargo, a pesar de numerosos intentos de desarrollar una alternativa comercial efectiva, las opciones en el mercado son escasas y su evaluación en ensayos *in vivo* en diferentes estudios, mostró solo protección limitada [Schukken y col., 2014; Landin y col., 2015]. Los modelos vacunales disponibles hasta el momento están dirigidos principalmente a *S. aureus*, aunque aún no hay correlación 100% efectiva en la protección contra mastitis por este patógeno [Boerhout y col., 2018].

En cuanto a los anticuerpos producidos por las vacunas estudiadas, los estudios se centran más en IgG1 e IgG2. La primera se asocia en leche a una reducción del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus* tanto *in vivo* como *in vitro*, lo cual sugiere un papel importante de este isotipo en la defensa del huésped. IgG1 es a su vez, el isotipo presente más abundante en la GM sana y facilita la fagocitosis por macrófagos, los predominantes en la leche normal [Howard, 1984; Paape y col., 2002]. La IgG2, se relaciona más frecuentemente con acumulación en los tejidos inflamados, promueve la fagocitosis por neutrófilos y por ende se cree que juega un papel importante durante etapas más tardías de la IIM. Otros isotipos como por ejemplo IgA son menos descritos en la literatura, este último se puede encontrar en las secreciones de la

mucosa como la leche, y previene infecciones de la mucosa por microbios aglutinantes [Hurley y Theil, 2011; Ezzat y col., 2014]. Varios estudios sugieren que los anticuerpos también juegan un papel en la defensa del huésped al neutralizar las proteínas de evasión inmune que se secretan por bacterias del género *Staphylococcus* durante el proceso de infección [Ortines y col., 2018; Rouha y col., 2018].

El fracaso de las vacunas disponibles actualmente en el mercado puede ser debido a una capacidad insuficiente para inducir una respuesta con capacidad neutralizante en la GM. Ambos factores, tanto la magnitud de la respuesta en cuanto a la cantidad de anticuerpos producidos, como la capacidad neutralizante de estos, son a su vez influenciados por otros factores agregados, como la vía de inoculación, la cantidad de dosis y los adyuvantes [Guy y col., 2005; Boerhout y col., 2015]. En bovinos se sabe que la vía de inoculación subcutánea cerca del ganglio linfático supramamario influye positivamente en la respuesta de anticuerpos tanto en leche como en suero [Tomita y col., 1998; Boerhout y col., 2015]. La llegada poco práctica a este sitio de inoculación, combinada con la cantidad de animales en los establecimientos lecheros, llevaron a muchos investigadores a buscar alternativas más viables. Hoy se sabe, que con una segunda dosis subcutánea en la tabla del cuello, se pueden alcanzar valores de anticuerpos similares a la dosis única en el ganglio linfático supramamario [Boerhout y col., 2018] y con un manejo más fácil para los productores y a su vez menos estresante para los animales. A pesar de los avances en los últimos años, la MB aún continúa siendo una patología difícil de abordar mediante la vacunación, siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias de inmunointervención.

I.1.6. Polímero Quitosano (Q)

Quitosano (Q) es un polisacárido de acetil-glucosamina parcialmente deacetilado obtenido de la Quitina, uno de los polímeros más abundantes de la naturaleza [Zhao y col., 2013] (Figura 4).

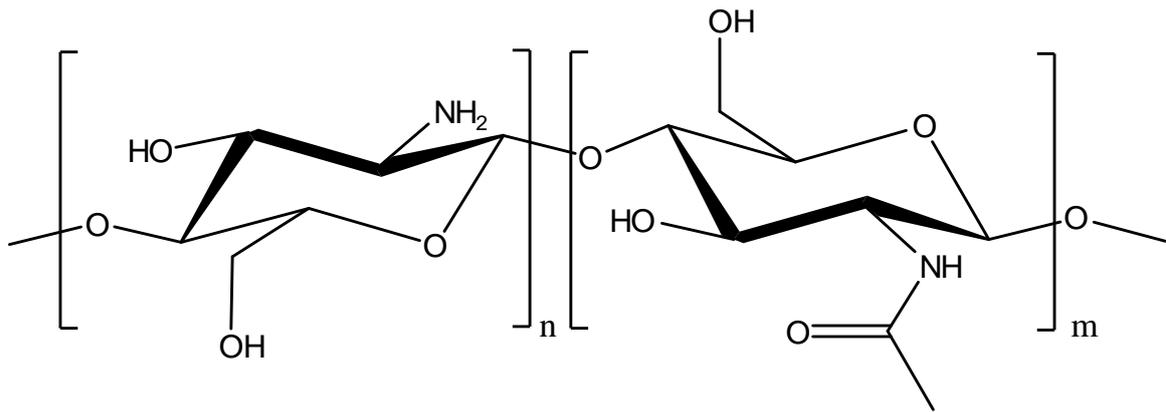


Figura 3. Quitosano: copolímero compuesto por unidades de β-(1→4)-2-acetamido-D-glucosa y β-(1→4)-2-amino-D-glucosa.

Éste polisacárido tiene importantes propiedades biológicas: es biocompatible, biodegradable y bioactivo, y presenta propiedades mucoadhesivas naturales [Arca y col., 2009]. Además, Q posee propiedades inmunomoduladoras potenciando la función de células inflamatorias [Porporatto y col., 2003] y actúa como modulador de la respuesta hacia antígenos proteicos en la mucosa intestinal [Porporatto y col., 2004; Porporatto y col., 2005; Porporatto y col., 2009a, 2009b]. No se puede dejar de considerar que este polisacárido es insoluble a pH alcalino y neutro, y solo soluble en ácidos orgánicos [Arca y col., 2009], por lo que ha sido necesario desarrollar diferentes alternativas para mejorar las propiedades físico-químicas. Entre las diferentes formulaciones se puede citar a las nano estructuras de Q (nanoQ) [Amidi y col., 2010]. Estos compuestos no solo conservan las propiedades activas del Q, sino que adquieren propiedades para ser utilizados como transportadores de fármacos o complejos proteicos, mejorando la capacidad de fusión con membranas biológicas y solubilidad en agua a pH fisiológico.

I.1.7. Antecedentes en el tema

En estudios previos realizados por el grupo de investigación de la Universidad Nacional de Villa María (UNVM), se investigó si las principales especies de *Staphylococcus* spp. involucradas en IIM bovinas presentaban características específicas que promovieran la colonización de la ubre. Se evaluó la capacidad de formación de *biofilm* y la distribución de genes asociados a la adhesión y formación de *biofilm* en *Staphylococcus* spp. aislados de animales infectados con MB en granjas lecheras argentinas. Para este propósito, se investigó la capacidad fenotípica de formación de *biofilm* de 209 aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de 15 establecimientos de la cuenca lechera de Villa María y laboratorios comerciales de las provincias de Córdoba y Buenos Aires [Felipe., 2015; Felipe y col., 2017]. Todos los aislamientos en estudio presentaron la capacidad para producir *biofilm in vitro*, siendo el 35.0% y el 45.0% de los 127 *S. aureus*, y el 51.0% y el 29.0% de los 82 SCN productores de biopelículas fuertes y moderados, respectivamente. Las muestras analizadas de *S. aureus* fueron positivas para la detección por PCR de los genes *icaA*, *icaD*, *clfA*, *clfB* y *fnbpA*, el 76.3% fueron positivas para el gen *fnbpB* y el 11.0% fueron positivas para el gen *bap*. En los aislamientos de SCN, las tasas positivas para *icaA* e *icaD* fueron del 73,2%, mientras que para los genes *clfA*, *clfB*, *fnbpA* *fnbpB* y *bap*, el porcentaje fue menor [Felipe., 2015; Felipe y col., 2017]. Estos resultados demostraron que en la formación de *biofilm* por *Staphylococcus* spp., el polisacárido y los genes asociados con adhesión y *biofilm* son de importancia en MB. Estos antecedentes establecen las bases para direccionar trabajos futuros en el estudio de estos factores específicos de patógenos que permitan el desarrollo de terapias de control más efectivas, siendo esencial considerar la capacidad de los aislamientos para producir *biofilm*.

En otro estudio llevado a cabo por la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC), el relevamiento de 51 tambos en la cuenca lechera de Villa María (Córdoba, Argentina), demostró como patógenos más prevalentes a los SCN (52.1%), seguido de *S. aureus* (21.3%) [Dieser y col., 2014]. Entre las diferentes especies de *Staphylococcus* pertenecientes al grupo de los SCN, *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* fueron las especies aisladas con mayor frecuencia, 46,6% y 32%, respectivamente, mientras que *S. warneri* y *S. xylosus* se encontraron en el 7,3% y 6,4% de los aislamientos [Bonetto., 2014; Raspanti y col., 2016]. Es importante

destacar que el 77,2% de los SCN aislados de IIM presentaron la capacidad de formar *biofilm* [Bonetto., 2014]. Dentro de los aislamientos de SCN pertenecientes a las especies aisladas con mayor frecuencia, el 75% de *S. chromogenes* y el 79% de *S. haemolyticus* presentaron esta habilidad. En las especies de menor prevalencia, la capacidad de formar *biofilm* también fue elevada, siendo para *S. xylosum*, *S. warneri* y *S. epidermidis* del 75,0%, 77,8% y 100%, respectivamente. Los genes *eno* e *icaAD* asociados a la formación de *biofilm*, se encontraron en el 70% y 74%, respectivamente [Bonetto., 2014].

Estos resultados demuestran la presencia e incidencia elevada de cepas de *Staphylococcus* spp con habilidad para establecerse en forma de *biofilm* en los animales de nuestra región, lo cual podría estar contribuyendo, conjuntamente con otros factores, a la resistencia a los tratamientos.

En lo que respecta a nuevas estrategias terapéuticas, a partir de estudios realizados en la UNVM, se demostró que quitosano (Q) de bajo peso molecular es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *S. xylosum* en forma dosis dependiente y de reducir la viabilidad bacteriana. Además, se demostró que Q inhibe la formación de *biofilm*, reduce la viabilidad de las biopelículas y promueve la erradicación de *biofilm* maduros de aislamientos bovinos [Felipe., 2015; Felipe y col., 2019]. Por otro lado, este polímero fue capaz de inhibir la internalización y adherencia de *S. aureus* en líneas celulares epiteliales de la GM bovina, y estimular una respuesta inflamatoria por parte del epitelio, lo cual podría favorecer la eliminación del patógeno [Porporatto y col., 2011; Felipe y col., 2015]. Así, este biomaterial se presenta como una sustancia atractiva para el desarrollo de nuevas terapias, en las cuales sus propiedades antimicrobianas e inmunoestimulantes puedan ser utilizadas [Felipe y col., 2015].

El éxito de una nueva estrategia terapéutica no puede ser logrado ignorando el principio fundamental de los *biofilm* bacterianos [Harro y col., 2010], lo cual aún debe ser caracterizado para los SCN. La elección de los antígenos y los adyuvantes que deberían usarse para la vacunación son de suma importancia para la protección deseada, siendo necesario aportar conocimiento al respecto.

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos se plantean en este trabajo de Tesis Doctoral la siguiente hipótesis y objetivos:

I.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los principales componentes proteicos de la matriz del *biofilm* producido por cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos con mayor capacidad de adherencia e internalización en células epiteliales de la GM bovina, son potenciales candidatos para el desarrollo de inmunógenos contra la MB causada por *Staphylococcus* spp.

I.3. OBJETIVOS

I.3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la patogénesis de cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) causantes de las infecciones intramamarias, asociadas a la formación de *biofilm* a fin de desarrollar un inmunógeno basado en los componentes de la matriz del *biofilm* como antígenos vacunales.

I.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar por PCR-RFLP del gen *gap* especies de SCN previamente aislados de muestras de leche de MB.
2. Evaluar la capacidad fenotípica de formar *biofilm in vitro* de los aislamientos bovinos de SCN caracterizados en el objetivo previo.
3. Evaluar mediante la amplificación por PCR la presencia de genes relacionados a factores de virulencia en cepas de las especies más prevalentes de SCN formadores y no formadores de *biofilm*.
4. Determinar la adherencia, internalización e inducción de respuesta inmune en células epiteliales de GM bovina frente a las distintas cepas de SCN en estudio.
5. Caracterizar la composición del *biofilm* de las cepas de interés.
6. Evaluar la respuesta inmune *in vivo*, luego de la inoculación subcutánea en bovinos, de un concentrado de cultivo de *biofilm* obtenido de la cepa seleccionada asociado a Q como adyuvante.

**Identificación a
nivel de especie
de *Staphylococcus*
coagulasa
negativos**



II.1. INTRODUCCIÓN

II.1.1. Identificación bacteriana en el laboratorio

En el diagnóstico de la mastitis, los SCN normalmente no son identificados a nivel de especies sino son tratados como un grupo homogéneo. La identificación de especies es costosa y además en la actualidad no se aplican tratamientos específicos para las diferentes especies de SCN. Sin embargo, dado que algunas especies de SCN afectan la salud de la GM más que otras [Persson Waller y col., 1997; Supré y col., 2011], la identificación de las distintas especies de *Staphylococcus* es importante ya que proporciona un valor predictivo para determinar si el microorganismo aislado tiene importancia clínica o si se trata de un contaminante. Además, permite obtener conocimiento de la patogénesis de las distintas especies estafilocócicas, información que resulta de utilidad en estudios epidemiológicos y en la toma de decisiones apropiadas para su manejo [Vanderhaeghen y col., 2014].

II.1.1.1. Métodos fenotípicos.

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del costo de las mismas. En la actualidad, y debido a que la identificación clásica resulta demasiado laboriosa y requiere de mucho tiempo, se han desarrollado varios sistemas comerciales manuales o galerías multipuebas e incluso algunos automatizados, entre ellos API Staph 32 (bioMérieux), RapID Staph (Remel) y *Staph-Zym* (Rosco Diagnostica), para la identificación de los SCN [Geraghty y col., 2013]. Se trata de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica y cada especie está definida por un código numérico, resultado de la codificación de las reacciones a las pruebas que se han utilizado. Sin embargo, presentan el inconveniente

de haber sido desarrollados principalmente para identificar cepas de origen humano [Heikens y col., 2005] y los resultados obtenidos para aislamientos bovinos no son completamente fiables por lo que requieren pruebas adicionales para la identificación final [Thorberg y Brändström, 2000; Bes y col., 2000; Couto y col., 2001]. Todas las marchas descritas hasta el momento, en base a caracteres fenotípicos, tienen resultados similares, algunas determinan quizás una especie más o una especie nueva, pero siempre queda un porcentaje de cepas que están en una ubicación intermedia debido a la variable expresión de las características fenotípicas de muchas especies de *Staphylococcus* [Bannerman y col., 1993; Ieven y col., 1995; Couto y col., 2001 Heikens y col., 2005]. Además de la variabilidad en la expresión, la interpretación de las características fenotípicas son los límites de la reproducibilidad de las pruebas, es decir, la capacidad de generar los mismos resultados cada vez que las pruebas se utilizan [Carretto y col., 2005].

II.1.1.2. Métodos moleculares

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos posibiliten la identificación más probable y no definitiva. Para superar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica —no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros— se han impuesto los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos [Supré y col., 2009; Piessens y col., 2010; Braem y col., 2011, Lange y col., 2015].

El análisis de ácidos nucleicos tiene como objetivo lograr una aproximación a la identificación a nivel de especie y tener una alta sensibilidad y especificidad [Drancourt y Raoult, 2002]. En los últimos años las técnicas basadas en reacciones de amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN), especialmente la de PCR, han sido ampliamente utilizadas para la tipificación bacteriana. En general existen tres grupos de variantes de la PCR: 1) aquellas en las que, utilizando cebadores arbitrarios o con cierta especificidad, se amplifican regiones del genoma localizadas entre dos cebadores

adyacentes separados por una distancia no superior a la que la Taq polimerasa puede amplificar. Estas variantes suelen dar patrones de amplificación constituidos por un número variable de bandas de ADN, 2) variantes en las que, previo o posterior a la amplificación génica, se somete el genoma o producto amplificado a digestión con enzimas de restricción, y 3) aquellas que amplifican regiones internas de ciertos genes y posterior secuenciación.

La amplificación por PCR de genes de vías universales y genes de función universal altamente conservados, pero con suficientes variaciones de secuencia que permiten una óptima identificación a nivel de especie, se está haciendo cada vez más frecuente [Goh y col., 1997; Mollet y col., 1997; Martineau y col., 1998; Yugueros y col., 2001].

El gen *gap*, el cual codifica una proteína de unión a transferrina de 42 kDa localizada dentro de la pared celular de *Staphylococcus* spp., está siendo utilizado como marcador filogenético para la identificación a nivel de especie dentro del género *Staphylococcus*. El análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) luego de la digestión con la enzima *AluI* del amplicón del gen *gap*, es una herramienta valiosa para la identificación de los *Staphylococcus*, independiente de la caracterización fenotípica [Yugueros y col., 2000; Ghebremedhin y col., 2008; Park y col., 2011; Onni y col., 2010; Hosseinzadeh y col., 2014; Srednik y col., 2015].

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. Cepas bacterianas

Cepas de campo: Se trabajó con una colección 133 cepas de SCN pertenecientes a los grupos de investigación, originalmente aisladas de muestras de leche de GM de bovinos de tambos en la cuenca lechera de Villa María, provincia de Córdoba [Dieser y col., 2014; Felipe y col., 2013, Somale y col., 2013, Raspanti y col., 2016; Felipe y col., 2017]. Las cepas en estudio corresponden al 35% del total de cepas de los dos grupos de investigación, UNRC y UNVM [Raspanti y col., 2016; Felipe y col., 2017].

Cepas de referencia: Se utilizaron como controles cepas pertenecientes a la colección americana de cultivos, American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus chromogenes* ATCC 43764, *Staphylococcus xylosus* (ATCC 29971), *Staphylococcus haemolyticus* (ATCC 29970), *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* (ATCC 25615), *Staphylococcus simulans* (ATCC 11631) y *Staphylococcus warneri* (ATCC 49454).

II.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo (Britania) se prepararon según las recomendaciones del fabricante en cada caso.

Caldo Tripticasa Soya (TSB): 30 gr/L de tripteina soya caldo.

Agar Tripticasa Soya (TSA): a la preparación anterior se adicionó agar-agar (Britania) a razón de 15 gr/L y 6 gr/L de extracto de levadura (Britania).

BBL™ CHROMagar™ *Staph aureus* (BD): 8,2 gr/L de agua purificada estéril.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C.

II.2.3. Reactivos, enzimas y soluciones stock.

Las drogas utilizadas fueron de grado analítico de las marcas Promega, Invitrogen y Sigma.

II.2.3.1. Extracción de ADN cromosomal

- EDTA 0,5M (pH: 8): EDTA deshidratado 186,1 gr/L, granallas de hidróxido de sodio (NaOH), agua destilada: El EDTA se disolvió en 800 mL de agua destilada utilizando un agitador magnético, luego se ajustó al pH deseado utilizando granallas de hidróxidos de sodio, se ajustó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.
- Tris 1M (pH: 8): Tris base 121,1 gr/L, HCl concentrado, agua destilada. Se disolvió el Tris base en 800 mL de agua destilada y se ajustó el pH adicionando el volumen necesario de HCl concentrado, se ajustó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.
- Sodio dodecil sulfato (SDS) al 20% (p/v) en Tris 50mM-EDTA 20mM pH 7,8.
- Cloroformo- alcohol isoamilico (49:1 v/v).
- Acetato Sódico (NaAc) 1M.
- Etanol 100%.
- Isopropanol frío 100%.
- Lisozima (10 ug/mL).
- Buffer SET: (EDTA 25 mM, Tris 20 mM, NaCl 75 mM).

II.2.3.2. Amplificación de ADN

La mezcla de reacción fue preparada a partir de los siguientes reactivos y soluciones stock, alcanzando un volumen final de 20 uL.

- Cebadores para la amplificación del gen *gap*:
GAP1 (5'-ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA-3') [25µM]
GAP2 (5'-GACATTCGTTATCATACCAAGCTG-3') [25µM].
- Solución dNTPs (Desoxirribonucleico trifosfato- dATP, dCTP, dGTP, dTTP) [25mM c/u] (Promega).
- Taq DNA polimerasa [5U/µL] (Promega).
- Buffer Taq Green (pH 8, 5), [5X] (Promega).
- MgCl₂ [25 mM] (Promega).
- Agua tridestilada libre de nucleasas (Promega).

II.2.3.3. Digestión de los productos del ADN amplificado

- Buffer B [10X]: 60mM Tris-HCl (pH7, 5), 500 mM NaCl, 60mM MgCl₂, 10mM MDT (Promega).
- Albumina sérica bovina [10X]: 10 mg/mL (Promega).
- Agua Tridestilada libre de nucleasas (Promega).
- Enzima de restricción *AluI*. [10U/μL] (Promega).

II.2.3.4. Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa

- Agarosa D1LE (Biodynamics).
- Buffer TAE [50X]. Composición por 1 L: 242 gr Tris base, 57,1 mL ácido glacial acético, 100 mL EDTA 0,5M pH8, agua destilada hasta llevar a volumen final.
- Buffer TBE [5X]. Composición por 1 L: 54 gr Tris base, 27,5 gr ácido bórico, 20 mL EDTA 0,5M pH8, agua destilada hasta llevar a volumen final.
- Bromuro de etidio 10 mg/mL (Sigma).
- Marcador 1kb: concentración [0,1 ug/uL] (Promega).
- Marcados 100pb: concentración [0,13 ug/uL] (Biodynamics).

II.2.4. Instrumentos y descartables

- Termociclador PTC-220 (MJ Reaserch inc.).
- Erlenmeyer, tubos de ensayo con tapa, ansas en rulo, placas de Petri, gradillas para tubos de ensayo, tubos tipo Khan, gradillas para tubos tipo Khan, tubos Eppendorff, gradillas para Eppendorff, pipetas con tips (p10, p100, p200, p1000, p5000).
- Balanza electrónica, vortex, mechero de Bunsen, Densicheck, heladera con freezer, campana de flujo laminar, baño termostatzado, estufa de cultivo, microondas, autoclave.

II.2.5. Condiciones generales de cultivo

Se realizaron cultivos planctónicos en tubos con 5 mL de TSB y se incubaron a 37°C por 16 hs para obtener cultivos en fase logarítmica.

II.2.5.1. Conservación de las cepas

A partir de una suspensión de 1 o 2 colonias, aisladas en cultivo puro, se sembró en 5 mL de TSB y se incubó 16 hs en estufa de cultivo hasta fase exponencial, se suplementó con glicerol estéril a una concentración del 20% para su posterior conservación en crio tubos a -80°C.

Para su posterior uso las bacterias fueron reactivadas mediante siembra en placas de TSA e incubadas en estufa a 37°C por 24 hs.

II.2.6. Identificación a nivel de especie de SCN

II.2.6.1. Pruebas bioquímicas confirmatorias

Una vez descongeladas las cepas, se realizaron pruebas bioquímicas para reconfirmar su pureza.

Tinción de Gram: Permite diferenciar especies bacterianas en dos grandes grupos, sobre la base de las propiedades físicas de sus paredes celulares.

Método: Se extendió la muestra recogida en un portaobjetos, y se dejó secar al aire. Se añadió cristal violeta 0,1%, se dejó durante 1 min para teñir todas las bacterias de color púrpura, se añadió lugol 2% sobre la preparación con restos de cristal violeta, se dejó durante 1 min, se lavó la muestra coloreada con agua, se decoloró con etanol 96° durante 30 s. Después se lavó de nuevo con agua para eliminar el alcohol y se tiñó con safranina durante 1 min, esta tinción de contraste permite teñir las bacterias que perdieron el cristal violeta. Luego se lavó la preparación con agua y se dejó secar para finalmente observar la muestra con objetivo de inmersión. Las bacterias de color violeta fueron clasificadas como Gram (+) y las de color rosa pálido Gram (-).

Prueba de catalasa: Determina la presencia de la enzima catalasa. La cual descompone el peróxido de hidrogeno que se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares en agua y oxígeno. Esta enzima está ausente

en el género *Streptococcus*.

Método: Con un ansa en rulo se recogió una colonia de un cultivo puro de 24 hs, se colocó sobre un portaobjetos, se agregó una gota de H₂O₂ al 30%. La formación inmediata de burbujas (liberación de O₂), se consideró como resultado positivo.

Prueba de coagulasa: Comprende la facultad de un microorganismo de coagular el plasma.

Método: Se mezcló 0,5 mL de cultivo puro con igual cantidad de plasma de conejo. Luego de un promedio de 4 hs de incubación en baño termostatzado a 37°C, la observación de coágulos o filamentos de fibrina visibles se interpretó como un resultado positivo. La coagulación puede ser completa o parcial. La prueba se consideró negativa cuando la suspensión se mantuvo homogénea en un periodo máximo de 24 hs.

II.2.6.2. Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD)

Previo a la identificación molecular, alícuotas de los congelados de las cepas de SCN fueron sembradas por estriado en el medio cromogénico selectivo y diferencial CHROMagar™ Staph aureus (BD), preparado y esterilizado según las indicaciones del fabricante. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 hs, luego se realizó identificación visual siendo clasificadas las colonias de color malva o rosado como *S. aureus* y las colonias celestes, beige o blancas como *Staphylococcus spp.*

II.2.6.3. Técnica de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción del producto de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del gen conservado *gap* (PCR-RFLP del gen *gap*)

II.2.6.3.1. Extracción de ADN cromosomal

La extracción de ADN se realizó según las condiciones descriptas por Pospiech y Neumann (1995) con ligeras modificaciones.

A partir de un cultivo puro por siembra en agotamiento se tomaron 3-5 colonias que fueron resuspendidas en 5 mL de TSB e incubadas por 24 hs a 37°C. Una alícuota de 1,5 mL de ese cultivo se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 500 uL de buffer SET, se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 min, se descartó sobrenadante y se agregaron 300 uL de

buffer SET. La suspensión se hirvió y congeló alternadamente por periodos de 5 min, repitiendo el proceso 3 veces. Se agregaron 3 uL de lisozima para lograr la ruptura de la pared celular y se incubó 1 hs a 37°C. Se agregaron 30 uL de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% para realizar la desnaturalización alcalina y lisis celular, y se incubó en baño María a 55°C por 1 h. Para precipitar el ADN cromosomal se agregaron 120 uL de acetato de sodio (NaAc) 3M y se incubó 10 min en hielo y luego se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante con el ADN a un nuevo tubo al que se adicionó 400 uL de cloroformo y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 10 min para así precipitar las proteínas de la suspensión. La fase acuosa (superior) de alrededor de 500 uL se transfirió a un nuevo tubo al que se le adicionó 500 uL de isopropanol frío y se incubó por 2 hs a -20°C. Se precipitó el ADN mediante centrifugación a 12.500 rpm a 4°C por 20 min. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 300 uL de etanol (70% v/v) y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente hasta evaporar el etanol por completo. Finalmente, se resuspendió el pellet (ADN) en 40 uL de agua libre de nucleasas (Biodynamics, Argentina) y se conservó a -20°C hasta su próximo análisis.

II.2.6.3.2. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones de amplificación del genoma bacteriano por PCR fueron optimizadas a partir de las condiciones descritas por Jayarao y col. (1992). Inicialmente se preparó una mezcla de reacción (mix) con todos los componentes, conteniendo: 5 µL de ADN molde, 10 µL de buffer Taq 5X, 1,6 µL de cada cebador, 0,8 µL de la mix de dNTPs, 0,5 µL de Taq polimerasa, 6 µL de MgCl₂ y 21,5 µL de agua libre de nucleasas en un volumen final de 50 µL. Las mezclas de reacción fueron preparadas en tubos de pared delgada tipo Eppendorff de 200 µL. En todas las reacciones se realizó un control negativo, el cual consistió en colocar todos los componentes de la mix a excepción de ADN, que se reemplazó por igual volumen de agua libre de nucleasas.

La amplificación consistió en un programa constituido por un paso de desnaturalización de 95°C por 90s y 40 ciclos de amplificación (desnaturalización del ADN a 95°C por 20s, hibridación de cebadores a 55°C por 30s y extensión a 72°C por 40s) y una extensión final a 72°C por 5 min. La PCR fue llevada a cabo en un equipo termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad, Estados Unidos). Los productos amplificados de cada muestra fueron visualizados en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/mL. Para determinar el peso molecular de cada producto de

PCR se comparó con un marcador de peso molecular de 1kb que se sembró en el mismo gel en una cantidad de 5 μL con 1 μL de buffer muestra 10%. La corrida se llevó a cabo 20 min a 75V.

II.2.6.3.3. Digestión enzimática de los productos obtenidos de la PCR

Se realizó con el empleo de los siguientes componentes para cada muestra: Buffer 10X: 2 μL , Albúmina (10 mg/mL): 0,3 μL , enzima de restricción *AluI* (10 U/ μL): 0,35 μL , agua libre de nucleasas: 7,35 μL y ADN amplificado 10 μL . Cada muestra con volumen final de 20 μL , se incubó por un periodo de 5 hs a 37°C en baño María.

II.2.6.3.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos que se obtuvieron luego de las reacciones de amplificación y digestión enzimática fueron corridos en geles de agarosa. Para el caso de las amplificaciones se utilizaron geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X teñidos con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio. Alícuotas de 7,5 μL de cada muestra fueron sembrados en cada calle de los geles. Se incorporó también la siembra del marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen).

Para los productos de digestión enzimática con la enzima de restricción *AluI* se corrieron geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio 0,5 $\mu\text{g/mL}$ en buffer TBE 1X. Se sembraron 7,5 μL de cada uno de los productos digeridos. Se comparó el peso molecular con un marcador de 100bp. Ambas corridas se realizaron a una potencia de 75V por el tiempo necesario (50-90 min).

Los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV y fotografiados con una cámara Cannon de 16,0 mega píxeles adosada a una computadora donde fueron almacenadas las imágenes en forma digital.

II.2.6.3.5. Análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción del gen *gap*

Las imágenes de los patrones de bandas obtenidos se registraron por inspección visual guiándonos por su marcador de peso molecular y los perfiles fueron comparados con otros de referencia obtenidos por Yugueros y col. (2000) y Park y col. (2011).

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Identificación bioquímica

De las 133 cepas analizadas por pruebas bioquímica tradicionales, todas mostraron el fenotipo coincidente a resultados previos, cocos Gram (+), catalasa (+) y coagulasa (-), (Figura 5).

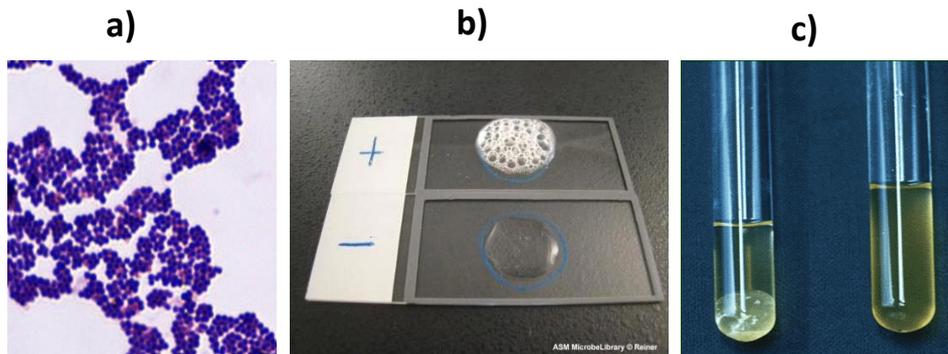


Figura 4. a) Tinción de Gram (+), b) prueba de catalasa, c) prueba de coagulasa.

II.3.2. Siembra en BBL™ CHROMagar™ Staph aureus (BD)

Del total de cepas analizadas, se descartaron 10 aislamientos por mostrar características fenotípicas distintas a las propias de su especie. Tres de ellas mostraron características coincidentes con *S. aureus* (colonias color malva) y otras siete revelaron contaminación evidente (más de un color de colonia) (Figura 6). Las 123 cepas restantes que mostraron la pureza y el color de colonia característico de especies de SCN y distinto al malva característico de *S. aureus*, fueron elegidas para el posterior análisis molecular.

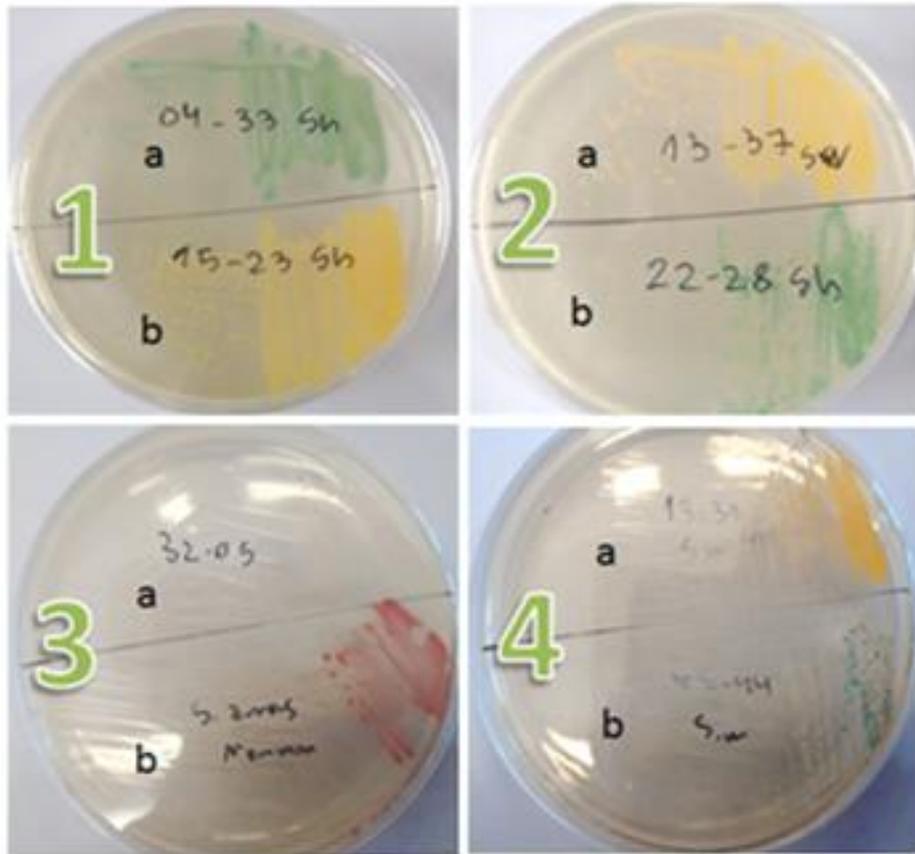


Figura 5. Cepas sembradas en medio selectivo y diferencial CHROMagar *Staph aureus*. 1a, 1b, 2a, 2b, 4a: Crecimiento puro de SCN colores varios, uniformes y distintos al malva 3b: Crecimiento de color malva, correspondiente a *S. aureus*, 4b: Contaminación evidente, dos morfologías de colonia de diferente color en el mismo estriado.

II.3.3. Identificación a nivel de especie de *Staphylococcus coagulasa negativos*: PCR-RFLP del gen *gap*

Como primer paso se realizó la puesta a punto de la técnica PCR-RFLP del gen *gap* utilizando las cepas de referencia descritas en materiales y métodos. El ADN cromosomal extraído fue utilizado como templado en la reacción de amplificación por PCR. El par de cebadores GAP1 y GAP2 permitió amplificar con éxito un fragmento de ~933 pb correspondiente al gen *gap*, en las cepas de referencia. Los amplicones obtenidos para cada cepa de referencia fueron luego digeridos con la enzima de restricción *AluI* y por electroforesis en gel de agarosa al 2% se comprobaron los patrones de fragmentos de restricción de longitud polimórfica específicos de especie (Figura 7), según lo informado por otros autores [Yugueros y col., 2000; Park y col 2011; Hosseinzadeh y col., 2014].

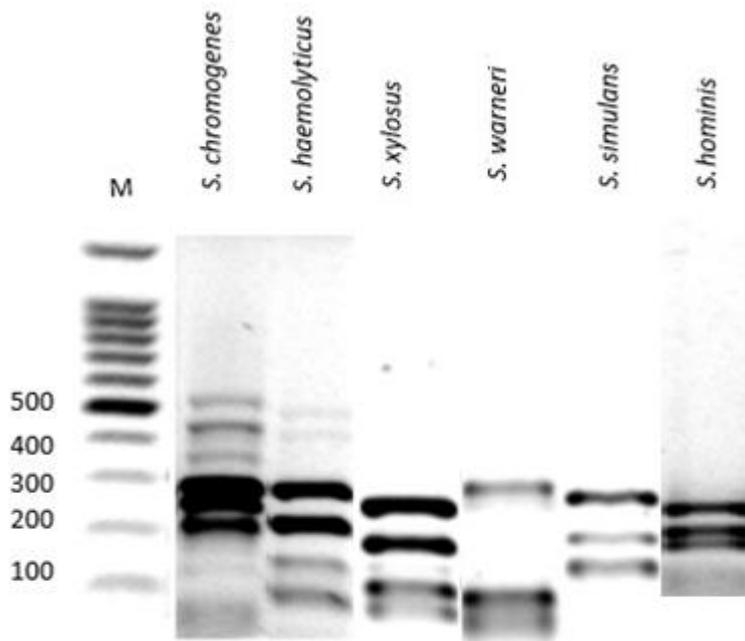


Figura 6. Patrón electroforético en gel de agarosa (2%) del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR del gen *gap* a partir de las seis cepas de referencia, luego de la digestión con la enzima de restricción *AluI*. M: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100 pb)

Finalizada la puesta a punto del método de identificación genotípico con las cepas de referencia se procedió a analizar los aislamientos bovinos de SCN obtenidos de leches de animales infectados. El par de cebadores GAP1 y GAP2 permitió amplificar satisfactoriamente el fragmento esperado del gen *gap*. La digestión con la enzima de restricción *AluI* permitió obtener perfiles característicos de especie para 118 aislamientos de SCN de origen bovino, comparando sus patrones de restricción con los obtenidos a partir de las cepas de referencia. Sólo cinco cepas no pudieron ser clasificadas por PCR-RFLP del gen *gap* por no presentar un patrón de bandas característico de especie de SCN.

Para validar el método de identificación molecular llevado a cabo en este estudio, fue necesario comparar la clasificación de especie obtenida según el patrón electroforético de los fragmentos de restricción de los 118 aislamientos con la identificación obtenida por espectrometría de masas, conocida como Ionización por desorción con láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (*MALDI-TOF MS* - por sus siglas en inglés). Esta técnica basada en perfiles proteicos y que es considerada un método de identificación de especies de SCN fiable [Park y col., 2011; Randall y col.,

2015; Pizauro y col., 2017] fue llevada a cabo en la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Buenos Aires, por gentileza de la Dra. Claudia Barberis. La total concordancia entre ambos métodos de identificación permitió considerar a PCR-RFLP del gen *gap* como método molecular confiable para la identificación de especie de los aislamientos de SCN de origen bovino.

II.3.4. Comparación del método molecular PCR-RFLP del gen *gap* con dos metodologías para la identificación de especies de SCN aisladas de leches bovinas

En la Tabla 1 se compara la identificación a nivel de especie obtenida en este estudio mediante PCR-RFLP del gen *gap* de los 118 aislamientos de SCN, con los resultados obtenido en un trabajo previo [Bonetto, 2014], donde la identificación a nivel de especie de los mismos aislamientos fue llevada a cabo por otro método molecular, PCR-RFLP del gen *groEL* y por un método comercial de identificación fenotípica, *Staph-Zym*TM.

La identificación por PCR-RFLP del gen *groEL* se correspondió en un 49,2% con la identificación llevada a cabo en este estudio por PCR-RFLP del gen *gap*. Si bien los métodos moleculares de identificación de especie tienen menos margen de error que las pruebas fenotípicas en la clasificación de SCN, [Taponen y col., 2006; Ghebremedhin y col., 2008; Capurro y col., 2009; Sampimon y col., 2009; Srednik y col., 2015; Lange y col 2015], la débil correspondencia entre ambos métodos moleculares puede deberse a que el método molecular de PCR-RFLP del gen *groEL* presenta la limitación de haber sido validado en comparación solo con métodos bioquímicos de referencia [Barros y col., 2007]. Menos satisfactoria aún resultó la identificación de especies obtenida de la lectura de los paneles de pruebas metabólicas y placas de sensibilidad a diferentes antibióticos del sistema de identificación comercial *Staph-Zym*TM, el cual permitió identificar presuntivamente a nivel de especie, sobre la base de una única sugerencia de identificación, sólo un 37,5% (44/118) de los aislamientos. Cuatro de los 74 aislamientos restantes (5,8%) mostraron registros numéricos no existentes en la lista de códigos del *Staph-Zym*TM y 20 (27%) dieron más de una posible identificación. La sensibilidad de la identificación del kit comercial fue más alta para *S. haemolyticus*,

Tabla 1. Identificación de especie de 118 SCN aislados a partir de leche bovina, mediante PCR-RFLP del gen *gap* y el número de aislamientos identificados correctamente mediante PCR-RFLP del gen *groEL* y *Staph-Zym*TM

Especie	N° de cepas identificadas por PCR-RFLP del gen <i>gap</i>	Correctamente identificadas por RFLP del gen <i>groEL</i>		Identificadas como		Correctamente identificadas por <i>Staph-Zym</i> TM		Identificadas como	
		SI n (%)	NO n (%)	SI n (%)	NO n (%)	SI n (%)	NO n (%)	SI n (%)	NO n (%)
<i>S. chromogenes</i>	44	28 (63,6)	16 (36,4)	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. xyloso</i> <i>S. simulans</i> <i>S. warneri</i> <i>S. capitis</i> <i>S. hyicus</i>	10 1 1 2 1 1	11 (25)	33 (75)	<i>S. warneri</i> <i>S. capitis</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. simulans</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. xyloso</i> S/identificar	12 10 3 3 2 2 1
<i>S. xyloso</i>	39	8 (20,5)	31 (79,5)	<i>S. chromogenes</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. warneri</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. simulans</i> <i>S. capitis</i>	14 11 3 1 1 1	7 (17,9)	32 (82,1)	<i>S. warneri</i> <i>S. chromogenes/S. simulans</i> <i>S. capitis</i> <i>S. haemolyticus/S. warneri/S. simulans</i> <i>S. chromogenes/S. hyicus</i> S/identificar	10 8 5 4 2 3
<i>S. haemolyticus</i>	25	20 (80)	5 (20)	<i>S. warneri</i> <i>S. simulans</i>	2 3	20 (80)	5 (20)	<i>S. warneri</i> <i>S. chromogenes/S. simulans</i>	3 2
<i>S. warneri</i>	10	2 (20)	8 (80)	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. chromogenes</i> <i>S. capitis</i>	5 2 1	6 (60)	4 (40)	<i>S. chromogenes/S. simulans</i> <i>S. chromogenes/S. haemolyticus</i>	2 2
TOTAL	118	58 (49,2)	60 (50,8)			44 (37,3)	74 (62,7)		

mediana para *S. warneri* y pobre o muy pobre para las dos especies más comúnmente halladas *S. chromogenes* y *S. xylosus*. Estos resultados son coincidentes con la bibliografía, debido a que los métodos basados en reacciones fenotípicas, muchas veces dan resultados contrapuestos en la identificación de las distintas especies de SCN [Capurro y col., 2009; Sampimon y col., 2009]

Si bien al comparar la identificación a nivel de especie obtenida previamente con la identificación de los mismos aislamientos de SCN llevada a cabo en este estudio, se observó un porcentaje de cepas sin coincidencia (Tabla 1), *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* y *S. warneri* siguieron siendo las especies más frecuentemente aisladas (Figura 8).

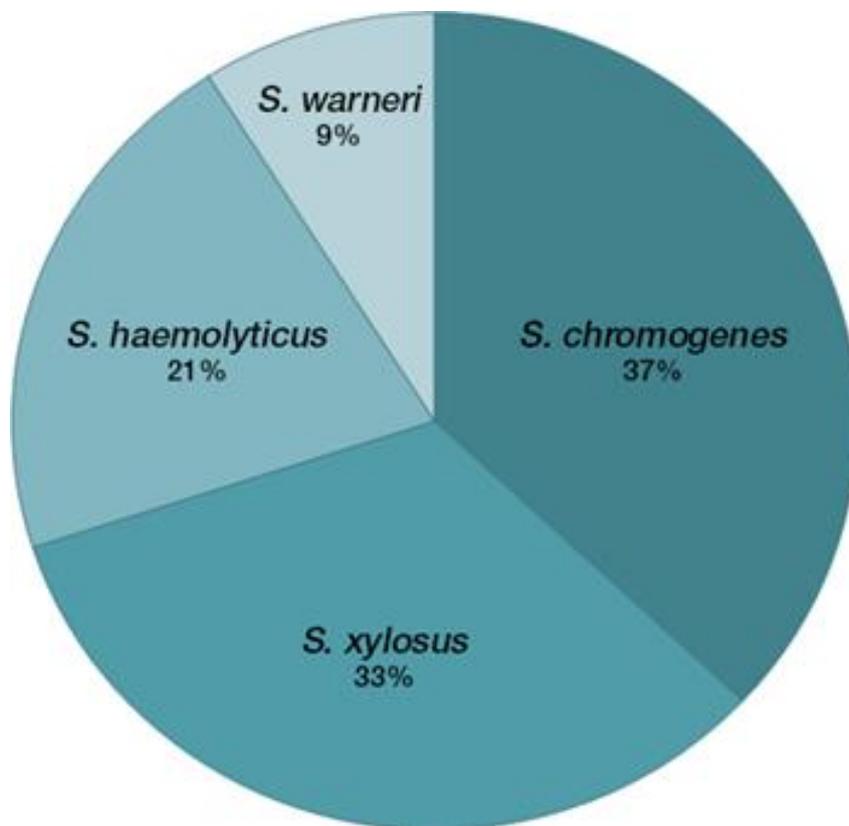


Figura 7. Prevalencia de las diferentes especies de SCN del total de aislamientos.

II.4. CONCLUSIONES PARCIALES

- Las especies de SCN más prevalentes en la totalidad de SCN de origen bovino estudiados resultaron ser *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* y *S. warneri*.
- El análisis del gen *gap* por PCR-RFLP resultó una técnica válida, comparada con otros métodos moleculares, como ser PCR-RFLP del gen *groEL* y *Staph-ZymTM*.

**Factores de
patogenicidad de
Staphylococcus
coagulasa negativos**



III.1. INTRODUCCIÓN

Se han descrito varios factores de virulencia involucrados en la patogenia de las infecciones causadas por SCN. Estos factores se pueden dividir en: a) enzimas; b) exotoxinas y c) componentes de la superficie celular [Hermans y col., 2004]. A nivel mundial numerosos estudios microbiológicos y moleculares han informado sobre los factores de virulencia producidos por SCN asociados a IIM en bovinos [Bjorland y col., 2005, Türkyilmaz y Kaya, 2006, Taponen y col., 2007]. Las especies de SCN han sido bien descritas en cuanto a comportamiento epidemiológico [Piessens y col., 2011] y al impacto en la salud de la ubre [Supre y col., 2011], aunque muchas preguntas quedan por aclarar en la participación de cada especie en la infección. Algunas especies de SCN son más capaces que otras de causar IIM persistentes; la diferencia puede atribuirse a determinados factores de virulencia, a la adaptación al desarrollo en la ubre o ambos [Thorberg y col., 2009].

III.1.1. Producción de *biofilm*

Las biopelículas (*biofilm*) son comunidades complejas de bacterias que crecen embebidas en una matriz compuesta principalmente por polisacáridos, ADN extracelular (ADNe) y proteínas, que se adhieren a superficies inertes o tejido vivo [Costerton y col., 1999] y representa la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. La formación de *biofilm*, permite que las bacterias se agreguen y formen macro colonias que crecen protegidas de la acción de antimicrobianos, anticuerpos, y de otros mecanismos de defensa del huésped, [Christensen y col., 1985; Davenport y col., 1986; Otto, 2004; Simojoki y col., 2012]. El potencial patogénico asociado con la capacidad de expresar adhesinas y formar *biofilm* es una estrategia de supervivencia que permite a las bacterias instalarse y colonizar un ambiente particular, de modo que el estado planctónico (aquel donde la bacteria se encuentra en forma independiente y no adherida a una comunidad) podría reducirse al paso de una superficie a otra, esto es, a la difusión, dentro de un ambiente particular, vivo o inerte (Figura 3).

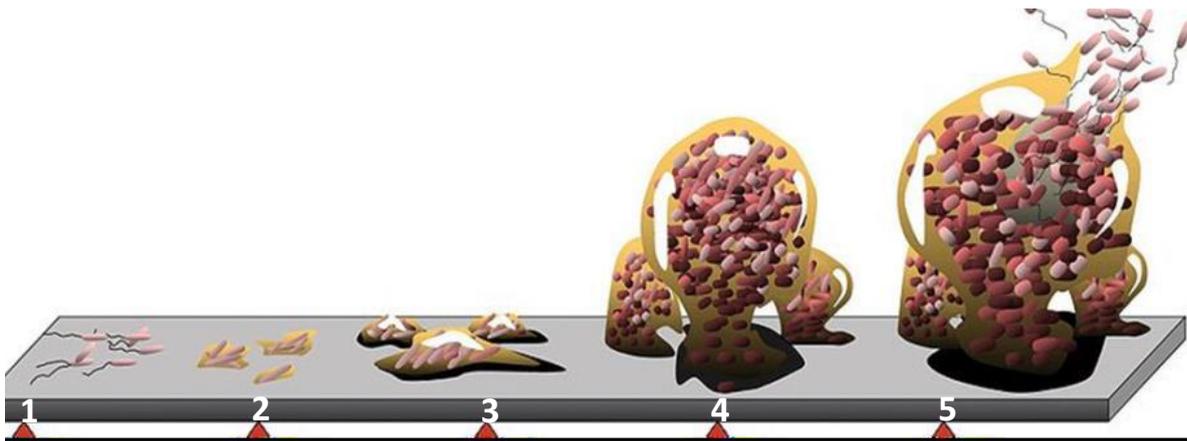


Figura 8: Etapas en el proceso de formación del *biofilm*: **1:** unión reversible, **2:** unión irreversible, **3:** maduración inicial, **4:** maduración final, **5:** dispersión (Adaptado de Sauer, 2003).

El desarrollo de MB estafilocócica, su persistencia o ambas dependen de la interacción entre bacterias invasoras y sistema de defensa del huésped, principalmente de las células inmunes de la GM infectada. Muchas especies de *Staphylococcus* presentan la habilidad de formar biopelículas y se estima que así resisten a la terapia antibiótica y a la acción del sistema inmunológico [Wellnitz y Bruckmaier, 2012].

La formación de *biofilm* por especies de *Staphylococcus* spp. está asociada a la síntesis del polisacárido de adhesión intercelular (PIA) que promueve la acumulación bacteriana, particularmente el poly-N-succinyl- β -1-6 glucosamina (PNAG), cuya síntesis se encuentra mediada por enzimas codificadas por el operón *icaABCD* [Gerke y col., 1998; McKenney y col., 1998]. Sin embargo, existen evidencias que estas bacterias pueden formar *biofilm* en ausencia de PIA/PNAG [Rohde y col., 2007]. Ciertas proteínas se asocian a la formación de *biofilm* o a la adhesión celular como: Aap (proteína asociada a la acumulación), Embp (proteínas de unión a la matriz extracelular), Bap (proteína asociada a la formación de *biofilm*), Fbe (proteínas de adhesión a fibrinógeno), ClfA y ClfB (factor de aglutinación) y FnbpA y FnbpB (proteínas de unión a fibronectina) [Cucarella y col., 2004; Tormo y col., 2005; Tremblay y col., 2013; Vanderhaeghen y col., 2014].

Varios genes que codifican factores de virulencia se encuentran localizados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (SaPIs), los cuales se transfieren horizontalmente entre las cepas, como es el caso del gen que codifica para la proteína Bap [Tormo y col., 2005]. Este movimiento horizontal de los elementos genéticos podría determinar la presencia en los SCN de genes asociados a *S. aureus* que codifican otros factores de virulencia. La presencia en SCN aislados de leche de genes

que codifican para polisacáridos asociados a *biofilm*, podría determinar la persistencia y virulencia de este tipo de infecciones a nivel intramamario, las cuales se presentan con una prevalencia cada vez mayor [Zuniga y col., 2015]. Sin embargo, la información disponible es escasa siendo necesario más estudios para caracterizar este mecanismo de virulencia en los SCN de origen bovino.

Dado que los *biofilm* juegan un papel importante en las infecciones causadas por SCN, la posibilidad de que la formación de *biofilm* esté asociada con la virulencia ha sido foco de atención de investigaciones en los últimos años [Piessens y col., 2012; Simojoki y col., 2012; Tremblay y col., 2013; Oliveira y col., 2015; Osman y col., 2015]. Aunque los *biofilm* no parecen afectar la severidad de la enfermedad [Simojoki y col., 2012; Tremblay y col., 2013; Osman y col., 2015], este tipo de crecimiento posiblemente juegue un rol en la persistencia en el ambiente intramamario [Tremblay y col., 2013]. Adicionalmente los aislamientos de SCN que crecen en *biofilm* son menos susceptibles a los antimicrobianos comúnmente usados en granjas, incluyendo combinaciones de penicilina G/novobiocina [Tremblay y col., 2014], entonces la formación de *biofilm* en las diferentes especies de SCN podría posiblemente impedir las terapias antimicrobianas.

III.1.2. Producción de enterotoxinas

Diferentes especies del género *Staphylococcus* que colonizan la piel y mucosas del hombre y los animales están asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) [ICMSF, 1996]. Cuando los estafilococos enterotoxigénicos proliferan en los alimentos, pueden producir toxinas responsables de la intoxicación alimentaria después que la comida se ingiere [Dinges y col., 2000; Le Loir y col., 2003]. Las toxinas, denominadas enterotoxinas estafilocócicas (SEs, Staphylococcal Enterotoxin), actúan sobre la mucosa intestinal produciendo la secreción masiva de líquidos a la luz del intestino y la consiguiente diarrea [López y col., 2008; Brizzio, 2009; Manfredi y col., 2010].

Las SEs pertenecen a la familia de los superantígenos (SAGs) y tienen un efecto importante en el sistema inmune del huésped a través de la subversión de la respuesta inmune y retraso en el establecimiento de la inmunidad específica del patógeno [McCormick y col., 2001; Fueyo y col., 2005; Seo y col., 2007]. Hay cinco serotipos clásicos de SEs, SEA, SEB, SEC, SED y SEE [Bergdoll, 1989]. Recientemente, han

sido descritos nuevos tipos de SEs (SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIR, SES, SET, SEIU y SEIV) [Vimercati y col., 2006; Nemati y col., 2008; Maslankova y col., 2009; De Oliveira Calsolari y col., 2011; Park y col., 2011]. La enterotoxina más comúnmente encontrada en alimentos es la enterotoxina A [Argudín y col., 2010]. Los diferentes serotipos SE son similares en composición y actividad biológica, pero son diferentes en la antigenicidad y por ello son identificadas serológicamente como proteínas separadas.

Las SEs son proteínas simples de bajo peso molecular, estables y resistentes a las enzimas proteolíticas, tales como tripsina y pepsina, lo que les permite ejercer su actividad en el tracto gastrointestinal [Podkowik y col., 2013]. Estas toxinas, además, presentan una termorresistencia aún mayor que los propios estafilococos [Bergdoll, 1983; Bennett, 1996]. De este modo, si no hay control de las temperaturas de conservación de la leche, materia prima de la industria láctea, previo al tratamiento térmico, el desarrollo microbiano permite la suficiente producción de SEs responsables luego de la intoxicación alimentaria, como lo demuestra el hecho que en muchos de los brotes descritos no se aísla el microorganismo aunque sí se detecta la enterotoxina en las muestras [Ikeda y col., 2005]. A pesar de que *S. aureus* es el agente más comúnmente involucrado en intoxicaciones alimentarias, varios estudios [Cunha y col., 2006; Calzolari y col., 2011; Piechota y col., 2014; Rall y col., 2014; Mello y col., 2016] han destacado la importancia de SCN toxigénicos aislados de leches provenientes de vacas sanas y de vacas con mastitis subclínica. Si bien la producción de SEs es característica de *S. aureus*, en los últimos años también se ha encontrado esta capacidad en diferentes especies de SCN de origen bovino [Park y col. 2011b; Unal y Cinar 2012; Guimarães y col., 2013; Fijałkowski y col., 2014; Rall y col., 2014; Piechota y col., 2014; Mahmoud y col., 2015; Mello y col., 2016; Mehmeti y col. 2016; Mahato y col., 2017]. La producción de SEs en los alimentos está condicionada no solo por la capacidad de la bacteria de producir toxinas sino además por la composición físico química del alimento, temperatura y tiempo de exposición de éste, de modo que favorezca el crecimiento del microorganismo [Cremonesi y col., 2007]. Se suma como factor de riesgo circunstancias de crecimiento que puedan incrementar la capacidad de supervivencia bacteriana como es el desarrollo de *biofilm*, lo que permite alcanzar niveles de contaminación que favorecen la producción de SEs en condiciones ambientales adecuadas.

Los genes que codifican para las enterotoxinas estafilocócicas pueden estar localizados en plásmidos, bacteriófagos, transposones o islas de patogenicidad y por transferencia horizontal de genes pueden ser transferidos entre diferentes especies de *Staphylococcus* [Yarwood y col., 2002; Omoe y col., 2003; Novick., 2003; Schmidt y Hensel, 2004, Gill y col., 2005; Piechota y col., 2014].

La técnica de PCR ha demostrado ser útil, rápida y una herramienta fiable para la detección de genes de enterotoxinas, dejando en evidencia la capacidad toxicogénica del microorganismo [Johnson y col., 1991; Becker y col., 1998; Tamaparu y col., 2001; Vasconcelos y col., 2011]. La determinación del tipo de SE producida por una cepa dada aporta datos importantes para el estudio bacteriológico, clínico, alimentario y medioambiental de un evento epidemiológico [ICMSF, 1992].

III.1.3. Resistencia antibiótica a β -lactámicos

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos cuya estructura molecular está conformada por un anillo β -lactámico heterocíclico que consiste en tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Su mecanismo de acción se basa en que son análogos de la D-alanil-D-alanina, el aminoácido terminal de las subunidades peptídicas precursoras de la barrera de peptidoglicanos, la cual es fundamental para la integridad estructural de la pared celular bacteriana, especialmente para los microorganismos Gram positivos. El paso final de la síntesis de los peptidoglicanos, la transpeptidación, se facilita por unas transpeptidasas denominadas proteínas de unión a penicilinas o PBPs (penicillin binding proteins) [Daza Pérez, 1998].

La similitud estructural que existe entre los antibióticos β -lactámicos y la D-alanil-D-alanina facilita su anclaje al sitio activo de las PBPs. El núcleo β -lactámico de la molécula se une irreversiblemente a la PBP. Esta unión irreversible evita el paso final (transpeptidación) de la formación de la barrera de peptidoglicanos, interrumpiendo la síntesis de la pared celular. Además, es posible que la inhibición de las PBPs mediante dicha unión irreversible, posibilite la activación de enzimas autolíticas de la pared celular bacteriana [Succhil y col., 2014].

Los tres grandes mecanismos de resistencia a β -lactámicos son: hidrólisis enzimática, alteración del sitio blanco y trastornos en la permeabilidad, [Vignoli y Seija, 2008]. La hidrólisis enzimática implica la inactivación de los β -lactámicos como consecuencia de

la acción de enzimas bacterianas que reciben el nombre de β -lactamasas, y es el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos [Odd y Maeland, 1997; Vignoli, y Seija, 2008]. Las β -lactamasas hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de las penicilinas (penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina), dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Actualmente este mecanismo de resistencia es muy frecuente tanto en *S. aureus* como en las diferentes especies de SCN y su diseminación es mundial. Sin embargo, las penicilinas estafilocócicas se inhiben con inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam) y por tanto estas cepas resultan sensibles a las combinaciones de β -lactámico con inhibidor de β -lactamasas. Asimismo, estas penicilinas no hidrolizan las penicilinas semi sintéticas (oxacilina, meticilina, cloxacilina, nafcilina) ni tampoco las cefalosporinas ni las carbapenemas que mantienen su actividad anti estafilocócica.

Las penicilinas semisintéticas, por ej.: oxacilina, meticilina, estables a la β -lactamasa estafilocócica, gracias a la ubicación estratégica de ciertas cadenas laterales en la molécula, fueron desarrolladas específicamente para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus sp.* productores de β -lactamasa. Sin embargo, la resistencia a este tipo de antibióticos pronto apareció debido al mecanismo de resistencia a β -lactámicos por modificación del sitio blanco.

La alteración del sitio blanco es un mecanismo de resistencia bacteriana donde se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc. De esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, confieren resistencia a los β -lactámicos, dado que esta enzima es su sitio de acción [Sussman y col., 2001]. Este mecanismo de resistencia se da debido a la expresión de un gen alternativo, que codifica una PBP básicamente distinta a la existente. Es el caso de la expresión del gen *mecA* el cual codifica para una PBP alternativa, denominada PBP2a que es menos afín a la totalidad de los β -lactámicos. La expresión fenotípica de la resistencia mediada por el gen *mecA* es compleja y se afecta por diferentes factores como la temperatura, el pH, la osmolaridad, la presencia de secuencias cromosómicas reguladoras y de otros genes cromosómicos no relacionados [Reygaert., 2009; Morosini y col., 2011].

Los trastornos de permeabilidad se corresponden fundamentalmente con la disminución de la expresión de porinas; no es un mecanismo que por sí mismo promueva altos niveles de resistencia, pero puede ser muy importante en conjunción con distintos tipos

de β -lactamasas.

Los SCN presentan mayor resistencia antimicrobiana que *S. aureus* y pueden incluso presentar la característica de multirresistencia [Taponen y Pyörälä., 2009]. El gen que codifica para β -lactamasa, denominado *blaZ* [Olsen y col., 2006], en general está localizado en plásmidos de pequeño tamaño que se pueden transferir de célula a célula por transducción. También se pueden localizar en plásmidos más grandes junto a los genes que codifican otros mecanismos de resistencia y se pueden transferir por conjugación, no solamente entre cepas de *S. aureus* sino también entre cepas de SCN [Sampimon y col., 2009].

El gen *mecA*, está localizado en un elemento genético móvil denominado “Cassette Cromosómico de *Staphylococcus*” (SCCmec). De esta manera la resistencia se adquiere por incorporación del cassette al cromosoma de cepas susceptibles [Vignoli y Seija., 2008, Berglund y col., 2008; Soares y col., 2012]. Publicaciones recientes informan el incremento en el número de SCN portadores del gen *blaZ* y productores de β -lactamasas, y portadores del gen *mecA* resistentes a todos los grupos de antibióticos β -lactámicos [Kot y col., 2012; Bochniarz y col., 2013, Raspanti y col., 2016; Srednik y col., 2017]. Se considera que los SCN actúan como reservorio de genes de resistencia para *S. aureus* [Tulinski y col., 2012].

III.1.4. Proteínas de superficie. Adherencia e internalización

Las IIM producidas por bacterias del género *Staphylococcus* se caracterizan frecuentemente por la capacidad de estas bacterias de colonizar las células tanto epiteliales como endoteliales de la ubre [Almeida, 1996; Oviedo-Boyso, 2008, 2011; Valle y col., 2012]. Esta capacidad para invadir las células y persistir en su interior juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones producidas por estos microorganismos y es considerada como una estrategia de evasión del sistema inmunológico, ya que no pueden ser detectadas por los fagocitos profesionales [Fraunholz y Sinha 2012]. También por otro lado resulta una protección frente a los agentes antibióticos [Oviedo-Boyso y col., 2011], pudiendo ser por este motivo causantes de infecciones de tipo crónicas.

El principal mecanismo de adhesión esta mediado por proteínas de unión a la fibronectina (FNBP) A y B, que permiten la interacción bacteria-célula vía un puente de fibronectina con receptores de fibronectina presentes en las células de mamíferos

(integrinas $\alpha 5 \beta 1$) [Sinha y col., 1999]. Otro mecanismo de adhesión de estos patógenos es a través de Clumping Factors (Clf) A y B, proteínas de unión al fibrinógeno, las cuales contribuyen a iniciar la infección [Zecconi y Scali., 2013]. Esta adhesión también previene al patógeno de la eliminación vía opsonofagocitosis, promoviendo la separación e inactivación de los componentes del complemento que median la opsonización [Hair y col., 2010].

Trabajos recientes sugieren que algunas especies de SCN relacionadas a bovinos como *Staphylococcus fleurettii*, están presentes muy frecuentemente en el ambiente de las vacas lecheras y aun así muy pocas veces causan IIM. Otras, como *Staphylococcus chromogenes*, colonizan los ápices del pezón y son comúnmente encontradas en leche y aun así son menos frecuentemente encontradas en el ambiente [Piessens y col., 2011; De Visscher y col., 2014; Vanderhaeghen y col., 2014; 2015]. Respecto a esto se ha demostrado que las especies de SCN epidemiológicamente diferentes, inducen también diferente respuesta inmune innata en las células del huésped, como ha sido demostrado en ensayos realizados en glándula mamaria murina [Breyne y col., 2015]. Se podría suponer que estas diferencias en la ecología y epidemiología entre especies de SCN podría ser la consecuencia de su distinta interacción con las células huésped en lo referente a adherencia, internalización y sobrevivencia.

Diversos estudios *in vitro* intentan reproducir los eventos involucrados en un proceso normal de infección *in vivo*, llevando a cabo ensayos con células MAC-T (del inglés: *Transformed mammary epithelial cells*), una línea de células epiteliales de origen mamario, que mantiene la capacidad de diferenciación y secreción de productos específicos de la leche [Huynh y col., 1991], lo cual la hace ideal para caracterizar la invasión intracelular por *Staphylococcus spp.* [Almeida, 1996; Bayles y col., 1998; Qazi y col., 2001; Hyvönen y col., 2009].

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Cepas bacterianas

Cepas de campo: Se trabajó con una colección 118 aislamientos de SCN identificados a nivel de especie mediante PCR-RFLP del gen *gap*, pertenecientes a los grupos de investigación de la UNVM y UNRC, originalmente aisladas de muestras de leche de GM de bovinos de tambos en la cuenca lechera de Villa María, provincia de Córdoba [Felipe y col., 2013; Somale y col., 2013; Dieser y col., 2014; Raspanti y col., 2016; Felipe y col., 2017].

Cepas control: para los ensayos de interacción con células epiteliales MAC-T se utilizó la cepa *S. aureus* Newbould 305 (ATCC 29740) como valor de referencia para los parámetros de adherencia, internalización y supervivencia.

Para la detección de genes de enterotoxinas (*sea-see*) se utilizaron las siguientes cepas control: *Staphylococcus aureus* FRI196E enterotoxina A (+) y enterotoxina D (+) y tres cepas cedidas gentilmente por la Mgtr. Verónica Neder del Grupo de investigación de Salud Animal, INTA Rafaela, las mismas fueron aisladas de leche de tanque de tambos de la cuenca central de Argentina (provincia de Santa Fé y Buenos Aires), caracterizadas a nivel de especie mediante cinco pruebas bioquímicas: test de coagulasa, catalasa, clumping factor, crecimiento en agar P y reducción de Voges-Proskawer. Se evaluó su capacidad de producción de enterotoxinas mediante el test de Ensayo inmunoenzimático (ELISA) de tipo sándwich: *S. aureus* Inta 07-487 enterotoxina B (+), *S. aureus* Inta 05-684 enterotoxina C (+) y *S. aureus* Inta 05-543 enterotoxina E (+).

Como cepa control para la detección de genes asociados a la resistencia a β -lactámicos se utilizó *S. aureus* ATCC 43300 (*mecA* + y *blaZ* +).

Se utilizaron como cepas control para la detección de genes asociados a formación de *biofilm* y adhesión celular las siguientes cepas de referencia: *S. aureus* Newman ATCC 25904 y *S. aureus* V329 gentilmente provista por el Dr. Iñigo Lasa (Instituto de Agrobiotecnología, Navarra, Valencia, España), procedente de animales con MB y caracterizada como híper formadora de *biofilm* (Genbank accession no. AY220730.1).

III.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo (Britania) se prepararon según las recomendaciones del fabricante en cada caso.

- Caldo Tripticasa Soya (TSB): 30 gr/L de tripteina soya caldo.
- Agar Tripticasa Soya (TSA): A la preparación anterior se adicionó 15 gr/L de agar-agar (Britania) y 6 gr/L de extracto de Levadura (Britania).
- Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de Penicilina/Strepto (Gibco), 1µg/mL de glucosa (Glutamax, Sigma) y 1µg/mL de Hidrocortisona (Sigma).
- Medio de congelación de células: DMEM suplementado, adicionado con 20% de DMSO-solución crio preservadora.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C, excepto el medio de cultivo celular (DMEM) que fue esterilizado por filtración (Filtro millipore 0,45µm Fisher Cientific).

III.2.3. Reactivos, enzimas y soluciones stock

Las drogas utilizadas fueron de grado analítico de las marcas Promega, Invitrogen y Sigma.

III.2.3.1. Tinción de Biofilm con cristal violeta:

- Solución Fisiológica (NaCl 0,9%).
- Cristal Violeta (0,1%) filtrado.
- Alcohol etílico 96° (Porta).

III.2.3.2. Extracción de ADN cromosomal

- EDTA 0,5M (pH: 8): EDTA deshidratado 186,1 gr/L, granallas de NaOH, agua destilada: El EDTA se disolvió en 800 mL de agua destilada utilizando un agitador magnético, luego se ajustó al pH deseado utilizando las granallas de NaOH, se ajustó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.
- Tris 1M (pH: 8): Tris base 121,1 gr/L, HCl concentrado, agua destilada. Se

disolvió el Tris base en 800 mL de agua destilada y se ajustó el pH adicionando el volumen necesario de HCl concentrado, se ajustó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

- SDS al 20% (p/v) en Tris 50mM-EDTA 20mM pH 7,8.
- Cloroformo- alcohol isoamilico (49:1 v/v).
- NaAc 1M.
- Etanol 100%.
- Isopropanol frio 100%.
- Lisozima.
- Buffer SET: (EDTA 25 mM, Tris 20 mM, NaCl 75 mM).

III.2.3.3. Amplificación de ADN por PCR

La concentración final y volumen de cada uno de los reactivos y soluciones que componen la mezcla de reacción para amplificar los genes relacionados a adherencia y formación de *biofilm* (*bap*, *clfA*, *clfB*, *fnbpA*, *fnbpB*, *icaA*, *icaD*, *agr*, *sar*, *aap*, *fbe*, *altE*, *embP*, *eno*, *cna*), producción de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*) y resistencia a antibióticos, (*blaZ* y *mecA*), se detallan en las Tablas 2-6. Los cebadores específicos para la amplificación de cada gen se detallan en las Tablas 7 y 8.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes de adherencia, *biofilm* (*bap*, *clfA*, *clfB*, *fnbpA*, *fnbpB*, *icaA*, *icaD*, *aap*, *fbe*, *embP*).

Reactivos (conc. stock)	Volumen	Concentración final
Buffer Taq Green (pH 8,5) 5X	10 μ L	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ L	2 mM
dNTPs (25mM c/dNTP)	0,5 μ L	250 μ M c/dNTP
Primer1 para c/gen (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Primer2 para c/gen (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Taq polimerasa 5U/ μ L)	0.4 μ L	2 U
Agua libre de nucleasas	26,1 μ L	
ADN	5 μ L	
Volumen final	50 μ L	

Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes de adherencia, *biofilm* (*altE*, *eno*, *cna*).

Reactivos (conc. stock)	Volumen	Concentración final
Buffer Taq Green (pH 8,5) 5X	10 μ L	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ L	1,5 mM
dNTPs (25mM c/dNTP)	0,4 μ L	200 μ M c/dNTP
Primer1 para c/gen (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Primer2 para c/gen (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Taq polimerasa 5U/ μ L)	0,25 μ L	1,25 U
Agua libre de nucleasas	27,35 μ L	
ADN	5 μ L	
Volumen final	50 μ L	

Tabla 4. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de los genes de adherencia, *biofilm* y enterotoxinas clásicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*).

Reactivos (conc. stock)	Volumen	Concentración final
Buffer Taq Green (pH 8,5) 5X	10 μ L	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ L	1.5 mM
dNTPs (25mM c/dNTP)	0.4 μ L	200 μ M c/dNTP
Primer1 para c/gen (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Primer2 para c/gen (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Taq polimerasa 5U/ μ L)	0.2 μ L	1 U
Agua libre de nucleasas	27.4 μ L	
ADN	5 μ L	
Volumen final	50 μ L	

Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen *blaZ*.

Reactivos (conc. stock)	Volumen	Concentración final
Buffer Taq Green (pH 8,5) 5X	10 μ L	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 μ L	0,8 mM
dNTPs (25mM c/dNTP)	0,4 μ L	200 μ M c/dNTP
Primer blaZ1(25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Primer blaZ2 (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Taq polimerasa 5U/ μ L)	0,4 μ L	2 U
Agua libre de nucleasas	28,6 μ L	
ADN	5 μ L	
Volumen final	50 μ L	

Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen *mecA*.

Reactivos (conc. stock)	Volumen	Concentración final
Buffer Taq Green (pH 8,5) 5X	10 μ L	1X
Primer <i>mecA</i> 1 (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
Primer <i>mecA</i> 2 (25 μ M)	2 μ L	1 μ M
dNTPs (25mM c/dNTP)	0.5 μ L	250 μ M c/dNTP
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ L	1.5mM
<i>Taq</i> polimerasa 5U/ μ L)	0.4 μ L	2U
Agua libre de nucleasas	27.1 μ L	
ADN	5 μ L	
Volumen final	50 μ L	

Tabla 7. Secuencia de cebadores utilizados para genes de enterotoxinas y resistencia antibiótica y tamaño de amplicón.

Gen	Producto	5' → 3' Secuencias de nucleótidos	Amplicón (pb)	T ^o hibrid. (°C)	Referencia
<i>sea1</i> <i>sea2</i>	Enterotoxina A	TTGGAACGGTTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	55	[Mello y col., 2016]
<i>seb1</i> <i>seb2</i>	Enterotoxina B	TCGCATCAAACCTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCC	478	55	[Mello y col., 2016]
<i>sec1</i> <i>sec2</i>	Enterotoxina C	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	257	55	[Mello y col., 2016]
<i>sed1</i> <i>sed2</i>	Enterotoxina D	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317	55	[Mello y col., 2016]
<i>see1</i> <i>see2</i>	Enterotoxina E	TAGATAAAGTTAAAACAAGC TAACTTACCGTGGACCCTTC	170	57	[Leke y col., 2017]
<i>blaZ1</i> <i>blaZ2</i>	β -lactamasa	AAGAGATTTGCCTATGCTTC GCTTGACCACTTTTATCAGC	517	50	[Sawant y col., 2009]
<i>mecA1</i> <i>mecA2</i>	PBP2	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533	52	[Sawant y col., 2009]

Tabla 8. Secuencia de cebadores utilizados para amplificación por PCR de genes de adherencia y *biofilm* y tamaño de amplicón.

Gen	Función	5' → 3' Secuencias de nucleótidos	Amplicón (pb)	T ^o hibrid. (°C)	Ref.
<i>clfA</i>	Factor de Aglutinación A	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG	292	53	Li y col. (2012)
<i>clfB</i>	Factor de Aglutinación B	ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC TTCGCACTGTTTGTGTTTGAC	205	52	Li y col. (2012)
<i>fnbpA</i>	Proteína de unión a Fibrinógeno A	CATAAATTGGGAGCAGCATCA ATCAGCAGCTGAATTCCCATT	127	52	Vancraeynest y col. (2004)
<i>fnbpB</i>	Proteína de unión a Fibrinógeno B	GTAACAGCTAATGGTCAATTGATACT CAAGTTCCGATAGGAGTACTATGTTC	524	52	Tristan y col. (2003)
<i>Bap</i>	Prot. asociada a <i>Biofilm</i>	CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTGCAC GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971	55	Cucarella y col. (2001)
<i>icaA</i>	Enzima involucrada en la sínt. de PIA	TATACCTTTCTTCGATGTCCG CTTTCGTTATAACAGGCAAG	561	47	Heilmann y col. (1996)
<i>icaD</i>	Enzima involucrada en la sínt. de PIA	AAACGTAAGAGAGGTGG GGCAATATGATCAAGATAC	381	47	Heilmann y col. (1996)
<i>Eno</i>	Proteína de unión a laminina	ACGTGCAGCAGCTGACT CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC	302	53	Tristan y col. (2003)
<i>Aap</i>	Proteína precursora amiloidea	GAAGCACCGAATGTTCCAACATC AGTTGGCGGTATATCTATTGTA	289	69	Rhode y col. (2005)
<i>Cna</i>	Proteína de unión a colágeno	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423	53	Seo y col. (2008)
<i>Fbe</i>	Proteína de unión al fibrinógeno	CTACAAGTTCAGGTCAAGGACAAGG GCGTCCGCGTATATCCTTCAG	273	55	Costerton y col. (1995)
<i>altE</i>	Autolisina asoc. a superficie	CAACTGCTCAACCGAGAACA TTTGTAGATGTTGTGCCCCA	682	53	Heilman y col. (1997)
<i>embP</i>	Unión a matriz extracelular	AGCGGTACAAATGTCAAT AGAAGTGCTCTAGCATCATCC	455	49	Banner y col. (2007)

III.2.3.4. Corrida electroforética de ADN en gel de agarosa

- Agarosa D1LE (Biodynamics).
- Buffer TAE [50X]. Composición por 1 Lt: 242 gr Tris base, 57,1 mL ácido glacial acético, 100mL EDTA 0,5M pH8, agua destilada hasta llevar a volumen final.
- 0Buffer TBE [5X]. Composición por 1 Lt: 54 gr Tris base, 27,5 gr ácido bórico, 20mL EDTA 0,5M pH8, agua destilada hasta llevar a volumen final.
- Bromuro de etidio 10 mg/mL (Sigma).
- Marcador 1kb: concentración [0,1 ug/uL] (Promega).
- Marcados 100pb: concentración [0,1 ug/uL] (Biodynamics).

III.2.3.5. Adherencia, internalización y sobrevivencia

- Tripsina 0,25%-EDTA 0,075% en PBS.
- Tritón 1% en PBS.
- Solución de PBS (10X).

Componentes:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Agua bidestilada c.s.p.	1000 mL

- Antibióticos: Gentamicina (Sigma) a concentraciones de 100 µg/mL y 25 µg/mL en medio de cultivo DMEM suplementado.

III.2.4. Instrumentos y descartables

- Termociclador PTC-220 (MJ Research inc.).
- Lector de micro placas (Labsystems Multiskan), micro placas.
- Erlenmeyer, tubos de ensayo con tapa, ansas en rulo, placas de Petri, gradillas para tubos de ensayo, tubos tipo Khan, gradillas para tubos tipo

Khan, tubos Eppendorff, gradillas para Eppendorff, pipetas con tips (p10, p100, p200, p1000, p5000).

- Balanza granataria, vortex, mechero de Bunsen, Densicheck, heladera con freezer, campana de flujo laminar, baño termostatzado, estufa de cultivo, microondas, autoclave.

III.2.5. Condiciones generales de cultivo bacteriano

Se realizaron cultivos planctónicos en tubos con 5 mL de TSB a partir de una única colonia y se incubaron a 37°C por 16 hs para obtener cultivos en fase logarítmica. Para cultivos en *biofilm* se inoculó, a partir de un cultivo O/N, 200µL por pocillo en una placa de micro titulación y se incubaron a 37°C por 16 hs.

III.2.5.1. Conservación de las cepas

A partir de una suspensión de 1 o 2 colonias, aisladas en cultivo puro, se sembró en 5 mL de TSB y se incubó 16 hs en estufa de cultivo hasta fase exponencial, se suplementó con glicerol estéril a una concentración del 20% para su posterior conservación en crio tubos a -80°C.

Para su posterior uso las bacterias fueron reactivadas mediante siembra en placas de TSA e incubadas en estufa a 37°C por 24 hs.

III.2.6. Evaluación de la capacidad de formación de *biofilm* (Método cuantitativo):

Existen muchos métodos en la actualidad para medir esta cualidad en SCN. Algunos de los más utilizados son el del agar rojo Congo desarrollado por Freeman y col. (1989) y el método en tubo de Christensen y col. (1989), ambos son de interpretación subjetiva por su naturaleza cualitativa.

En este trabajo se utilizó el método de cuantificación en placa de 96 pocillos de fondo plano según Christensen y col. (1989), con ligeras modificaciones según Stepanovic y col. (2000; 2007), que refuerzan la fiabilidad de la prueba.

Para esto a partir del caldo de cada cepa se realizaron cultivos de siembra con ansa por agotamiento en superficie en TSA durante 18 hs a 37°C, para observación de desarrollo y control de pureza. A partir de este cultivo, se inocularon 2 a 3 colonias en TSB, el

caldo fue incubado a 37°C por 3 a 5 hs, hasta lograr ajuste de turbidez compatible con el estándar 0,5 de Mc Farland, utilizando para medir la densidad óptica el dispositivo DensiCheck Inmediatamente después de ajustado el inóculo se sembraron por cuadruplicado para cada aislamiento 200 µL en placas para cultivo de células de 96 pocillos con fondo plano (Greiner Bio-One, Alemania) y se incubaron por 24 hs a 37°C. A su vez se inocularon también por cuadruplicado, 200 µL de medio TSB estéril y 200 µL de las cepas de referencia con conocida capacidad de formación de *biofilm* descriptas más arriba en esta misma sección, como control negativo y positivo respectivamente.

Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el contenido de los pocillos y se lavaron cuidadosamente para no desprender el *biofilm* formado, con el mismo volumen de solución fisiológica (NaCl 0,9%) 3 veces. Se secaron las placas en estufa a 60°C por una hora para fijar el *biofilm* y se añadió a cada pocillo 200 µL de cristal violeta al 0,1% (p/v) filtrado, se dejó reposar durante 15 min y se descartó, se lavó 3 veces cada pocillo con agua destilada y se dejó secar la placa invertida durante 24 hs a temperatura ambiente. Se añadió a cada pocillo 200 µL de alcohol 96° y se dejó reposar por 30 min para remover el colorante adherido. Transcurrido este tiempo se pasaron a una placa limpia 100 µL de contenido de cada pocillo y se determinó la DO_{570nm} en el lector de micro placas Multiskan TM FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, Estados Unidos). En caso de obtener valores superiores a uno, se realizaron diluciones al 50% con agua destilada.

La DO de cohorte (DOc) se definió siguiendo la metodología de Li y col. (2012) como el valor de la media de la DO del control negativo, más tres desviaciones estándar por encima de la misma.

Los aislamientos se clasificaron a partir de la DOc (0,026) en no formadores (NF), débiles (D), intermedios (I) y fuertes (F) según se muestra en la Tabla 9. El valor de DOc fue obtenido a partir del promedio de las mediciones del control negativo realizadas por cuadruplicado en tres ensayos, el valor obtenido fue 0,023 y a este valor se le sumo tres veces el desvío estándar que para este promedio fue 0,001. A partir de este valor de corte se establecieron los rangos para clasificar cuantitativamente la capacidad de formar *biofilm* (D, I, F) de las cepas pertenecientes a las distintas especies analizadas.

Tabla 9. Clasificación de la capacidad para formar *biofilm* adaptada a los valores en estudio.

Consideración DO ¹	Valor DO	Clasificación
DO < DOc	<0,026	NF
DOc < DO < 2DOc	0,026 - 0,052	D
2DOc < DO < 4DOc	0,052 - 0,104	I
DO > 4DOc	> 0,104	F

¹: Adaptado de Li y col. (2012)

DO: densidad óptica, DOc: densidad óptica de corte, NF: no formadora, D: débil, I: Intermedio, F: fuerte

III.2.7. Amplificación por PCR de genes relacionados a adherencia y formación de *biofilm*, genes de enterotoxinas y genes asociados a resistencia a β -lactámicos

Se analizó un total de 18 cepas, entre las tres especies aisladas con mayor prevalencia de tambos pertenecientes a la cuenca lechera de Villa María, *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. haemolyticus*. Se seleccionaron 3 cepas con alta habilidad y 3 cepas con baja habilidad para producir *biofilm* de cada una de las tres especies en estudio.

III.2.7.1. Extracción de ADN cromosomal

La extracción de ADN se realizó según las condiciones descriptas por Pospiech y Neumann (1995) con ligeras modificaciones. A partir de un cultivo puro por siembra en agotamiento se tomaron 3-5 colonias que fueron resuspendidas en 5 mL de TSB e incubadas por 24 hs a 37°C. Una alícuota de 1,5 mL de ese cultivo se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 500 uL de buffer SET, se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 min, se descartó sobrenadante y se agregaron 300 uL de buffer SET. La suspensión se hirvió y congeló alternadamente por periodos de 5 min, repitiendo el proceso 3 veces. Se agregaron 3 uL de lisozima para lograr la ruptura de la pared celular y se incubó 1 h a 37°C. Se agregaron 30 uL de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% para realizar la desnaturalización alcalina y lisis celular, y se incubó en baño María a 55°C por 1 h. Para precipitar el ADN cromosomal se agregaron 120 uL de NaAc 3 M y se incubó 10 min en hielo para luego centrifugarlo a 13.000 rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante con el ADN a un nuevo tubo al que se adicionó 400 uL de cloroformo y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 10 min para precipitar las proteínas de la suspensión. La

fase acuosa (superior) de alrededor de 500 uL se transfirió a un nuevo tubo al que se le adicionó 500 uL de isopropanol frío y se incubó por 2 hs a -20°C. Se precipitó el ADN mediante centrifugación a 12.500 rpm y 4°C por 20 min. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 300 uL de etanol (70% v/v) y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente hasta evaporar el etanol por completo. Finalmente, se resuspendió el pellet (ADN) en 40 uL de agua libre de nucleasas (Biodynamics, Argentina) y se conservó a -20°C hasta su próximo análisis.

III.2.7.2. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones de amplificación del genoma bacteriano por PCR fueron optimizadas a partir de las condiciones descritas por Jayarao y col. (1992).

- Se prepararon las mezclas de reacción (mix) en un volumen final de 50 µL con todos los componentes según Tabla 3-7.
- Las mezclas de reacción fueron preparadas en tubos de pared delgada tipo Eppendorff de 200 µL. En todas las reacciones se realizó un control negativo, el cual consistió en colocar todos los componentes de la mix a excepción de ADN, que se reemplazó por igual volumen de agua libre de nucleasas.
- La PCR fue llevada a cabo en un equipo termociclador T100 Thermal Cycler (Biorad, Estados Unidos).
- Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno consistió de un paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min, un paso de unión de los cebadores a las secuencias complementarias a la temperatura indicada para cada amplicón (Tablas 8 y 9) durante 1 min, y elongación a 72°C durante 1 min, con una extensión final a 72°C durante 5 min.

III.2.7.3. Electroforesis en gel de agarosa

La corrida electroforética de los productos amplificados por PCR se llevó a cabo en geles de agarosa 2% en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de etidio 0,5 µg/mL durante (40-90 min) a 75V.

Los geles fueron visualizados en un transiluminador con luz UV y fotografiados con una cámara Cannon de 16,0 mega píxeles adosada a una computadora donde fueron

almacenadas las imágenes en forma digital.

El peso molecular de cada producto de PCR se determinó por comparación con el marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen) sembrado en el mismo gel.

III.2.8. Adherencia/Internalización y sobrevivencia en la línea celular MAC-T

III.2.8.1. Conservación y mantenimiento de la línea celular durante el periodo de ensayo

Durante el periodo de ensayo, la línea celular se mantuvo a una temperatura de 37°C en una estufa de cultivo con aporte constante de CO₂ a una concentración de 5%, cambiando el medio de cultivo que cubría la monocapa cada 48 hs. Cada vez que ésta llegó a crecimiento confluyente (continuo y uniforme), fue necesario bajar la carga para permitirles seguir creciendo. Para ello se utilizó una solución de Tripsina-EDTA que las despegó de la superficie adherida y permitió realizar una dilución hasta la concentración deseada. El stock de células se mantuvo en nitrógeno líquido, en una solución de medio de congelación. Para congelar los cultivos fue necesario tomarlos en fase logarítmica y del pasaje más bajo posible, fraccionando y llenando los criotubos solo hasta $\frac{3}{4}$ de su volumen total. Los criotubos fueron rotulados: línea celular, pasaje, n° de células, fecha. Previo a cada ensayo las células fueron descongeladas colocando el contenido de un criotubo en una placa o frasco estéril correctamente rotulado con fecha y hora de descongelación y adicionando con cantidad suficiente del medio de cultivo suplementado. El medio de cultivo fue cambiado totalmente a las 24 hs de incubación para eliminar restos de DMSO y se continuó con la incubación en las condiciones ya descritas por 24 hs más. El cultivo fue tripsinizado para obtener las células en suspensión.

III.2.8.2. Ensayo de adherencia, internalización y supervivencia intracelular de SCN en MAC-T

Previo a los ensayos se realizó la puesta a punto y recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC) a emplear, a los efectos de utilizar una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés) similar para todas las cepas a ser evaluadas. Para ello se preparó una suspensión con la bacteria seleccionada y se realizó la lectura

con un densitómetro hasta obtener una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (aprox. 10^8 UFC/mL). Con la suspensión madre se realizaron diluciones en base 10, y 100 μ l de las últimas cuatro diluciones fueron sembrados por duplicado en placas con TSA e incubados en estufa a 37°C por 24 hs. Los recuentos de las UFC se realizaron en las diluciones donde fue posible contar de 3 a 30 UFC. Una vez estandarizado el número de UFC/mL correspondiente a una suspensión al 0,5 McFarland para cada cepa, se comenzó con los ensayos.

Para la relación bacteria/célula se utilizó una MOI de 10. Para ello se prepararon las suspensiones bacterianas, luego del cultivo de cada cepa en 5 mL de medio TSB a 37°C durante 18 hs, que fueron llevadas a 0,5 en la escala de McFarland y diluidas utilizando como referencia los valores obtenidos en el recuento de UFC descrito previamente. Por otra parte, el número de células epiteliales por pocillo fue estimado contando en una cámara de Neubauer, previo al sembrado, y diluyendo hasta un número que permita obtener la cantidad deseada luego de 24 hs.

Posteriormente, se procedió a realizar el ensayo para determinar la capacidad de SCN de adherirse e invadir a las MAC-T siguiendo las metodologías de Elhadidy y Elsayyad, (2013) y Daw y col., (2012) con modificaciones.

Los ensayos se realizaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Sigma). Veinticuatro horas antes del experimento los pocillos se inocularon con 200 μ L de una suspensión de células con una concentración aproximada de 5×10^5 cel/mL, se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C con un aporte constante de 5% CO₂ y el día del experimento se comprobó, mediante recuento de las células presentes en uno de los pocillos, que hubiera una concentración aproximada al doble de lo inoculado.

Para llevar a cabo el ensayo, se sustituyó el medio de cultivo por el mismo volumen de las suspensiones correspondientes a las 18 cepas en estudio, que fueron co-cultivadas con la monocapa confluyente de células MAC-T durante 2 hs a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Los análisis para cada cepa fueron llevados a cabo por triplicado para cada ensayo (adherencia, internalización y supervivencia) en tres ensayos independientes.

Posteriormente al co-cultivo, las monocapas celulares fueron lavadas 3 veces con PBS 1X pH: 7,4 y el triplicado de los pocillos correspondientes al ensayo de adherencia fueron tratados con Tritón 1% en PBS para liberar los estafilococos intracelulares. Las UFC/mL fueron determinadas por la técnica estándar de recuento en placa.

En paralelo 3 pocillos para el ensayo de internalización fueron, además, previo al paso de lisis celular, tratados con gentamicina (Sigma) 100 μ g/mL en medio DMEM a 37°C

en atmósfera de 5% CO₂ durante 1 h para eliminar las bacterias extracelulares, libres y adheridas. Nuevamente se trató con Tritón 1% para liberar las bacterias intracelulares y hacer el posterior recuento de UFC/mL.

Por último, en los 3 pocillos restantes se adicionó un paso más, sustituyendo la gentamicina 100 µg/mL, por una concentración más baja (25 µg/mL) del mismo antibiótico en medio DMEM a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ y se incubó durante 23 hs más para investigar la capacidad de supervivencia de las bacterias internalizadas durante este periodo, al cabo de este tiempo, se llevó a cabo la lisis celular con Tritón y se realizó el recuento de UFC. Cada ensayo por triplicado se realizó en 3 oportunidades.

III.2.9. Análisis estadístico

Se describió la frecuencia de genes asociados a los diferentes factores de virulencia, producción de enterotoxinas clásicas, resistencia a antibióticos, capacidad de formar *biofilm* y capacidad de interacción con las células epiteliales mamarias, en las especies de SCN más frecuentes, para cada categoría establecida según la capacidad de formar *biofilm*.

El estudio de las diferencias entre las especies en las capacidades de formar *biofilm* se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) a una vía de clasificación, seguido de la prueba de comparaciones Bonferroni [Stoline., 1981].

Los datos fueron analizados con el software estadístico InfoStat. [InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina]. Para examinar posibles diferencias entre las especies en las capacidades de formar *biofilm* como también en la de adherir, internalizar y sobrevivir en células epiteliales mamarias, se realizó análisis de la varianza (ANOVA) a una vía de clasificación, seguido de la prueba de comparaciones Bonferroni. Se determinaron diferencias significativas utilizando un nivel de significancia del 5%.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1. Formación de *biofilm*: evaluación de la capacidad fenotípica de forma cuantitativa

Se utilizó la técnica de cultivo en placa de 96 pocillos de fondo plano como se describió en materiales y métodos. La mayoría (92,4%) de los aislamientos analizados presentaron la habilidad para formar *biofilm* (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de la producción de *biofilm* entre especies de SCN

Información	Especies de SCN				Total (%)
	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. xylosum</i>	<i>S. haemolyticum</i>	<i>S. warneri</i>	
Número de aislamientos (%)	44 (37,3)	39 (33)	25 (21,2)	10 (8,5)	118 (100)
Biofilm, n (%)					
No Formador ($A_{570} < 0,026$)	7 (15,9)	1 (2,6)	0 (0)	1 (10)	9 (7,6)
Débil ($A_{570} 0,026-0,052$)	15 (34,1)	3 (7,7)	2 (8)	1 (10)	21 (17,8)
Intermedio ($A_{570} 0,052-0,104$)	9 (20,5)	2 (5,1)	3 (12)	2 (20)	16 (13,6)
Fuerte ($A_{570} > 0,104$)	13 (29,5)	33 (84,6)	20 (80)	6 (60)	72 (61)

El elevado porcentaje de cepas formadoras de *biofilm* hallado en este estudio coincide con los estudios de Darwish y col. (2013) en Egipto, y Srednik y col. (2017) en Argentina quienes informaron a partir de aislamientos de leches bovinas provenientes de mastitis subclínica un 94,1% y 96,7% de cepas de SCN con capacidad de formar *biofilm*, respectivamente.

En otros estudios se informaron porcentajes similares, aunque algo menores. Así Tremblay y col. (2013), informaron que de 255 aislamientos de SCN obtenidos a partir de muestras de leches provenientes de tambos de Canadá, la mayoría (85.1%) de los aislados ensayados eran *biofilm* positivos. Da Costa Krewer y col. (2015) mostraron un 87% de cepas productoras de *biofilm* a partir de aislamientos obtenidos de vacas

lactantes pertenecientes a tambos en los estados de Bahía y Pernambuco en Brasil. Algo menor fue el porcentaje informado en el trabajo de Marques y col. (2013), quienes observaron que de 145 aislamientos de SCN de muestras de leche bovina a partir de establecimientos lecheros del sur de Brasil, 74,5% fueron formadores de *biofilm*.

Es interesante destacar que del total de los aislamientos positivos para la formación de *biofilm* descritos en este estudio, el 66%, (72/109), 14,7% (16/109) y 19,3% (21/109) resultaron fuertes, intermedios y débiles formadores de *biofilm*, respectivamente (Tabla 10). Porcentajes más bajos de cepas con fuerte habilidad para formar *biofilm* fueron informados en otros estudios desde 23,1% [Tremblay y col., 2013], 25,7% [da Costa Krewer y col., 2015] y 29,5% [Darwish y col., 2013] hasta 35,6% [Srednik y col., 2015].

La CFB mostró variaciones en las distintas especies. De las cuatro especies más prevalentes, *S. xylosus* y *S. haemolyticus* resultaron las mayores productoras de *biofilm*, con 84,6% y 80% de los aislamientos fuerte formadores, mientras que solo el 29,5% de los aislamientos identificados como *S. chromogenes* presentaron esta capacidad (Tabla 10; Figura 9).

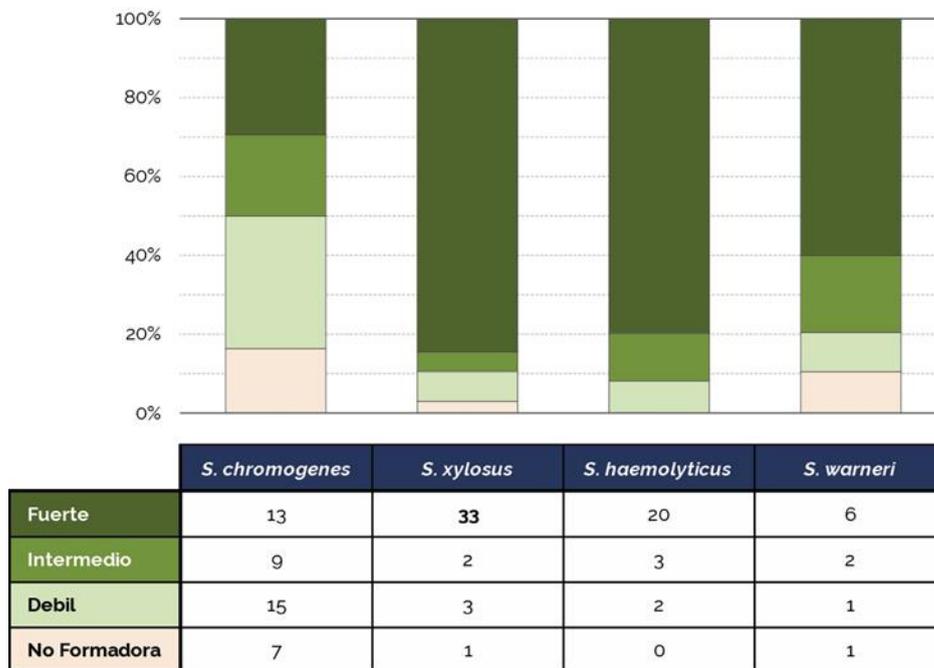


Figura 9. Porcentaje de cepas de las principales especies de SCN según la capacidad de formar *biofilm*

Los porcentajes de cepas formadoras de *biofilm* para las especies *S. chromogenes* (84%), *S. xylosus* (97,4%) y *S. haemolyticus* (100%), fueron similares a los mostrados

en el estudio de Tremblay y col., (2013), en el cual para las mismas especies los porcentajes fueron 84,7%, 92% y 93,3%, respectivamente.

La mayoría de las cepas de *S. xylosus* (89,7%; 35/39), *S. haemolyticus* (92%; 23/25) y *S. warneri* (80%; 8/10) resultaron moderados a fuertes formadores de *biofilm*, mientras que el 50% (22/44) de las cepas de *S. chromogenes* fueron negativas o débiles formadoras de *biofilm*. Se utilizó el valor medio de todos los aislamientos de cada especie para evaluar la capacidad para formar *biofilm* por los SCN, mostrando los aislamientos de la especie *S. xylosus* el valor de mediana más alto para sus aislamientos y *S. haemolyticus* tuvo la segunda mediana más alta (Figura 9). *Staphylococcus chromogenes* tuvo el valor de mediana más bajo (Figura 10).

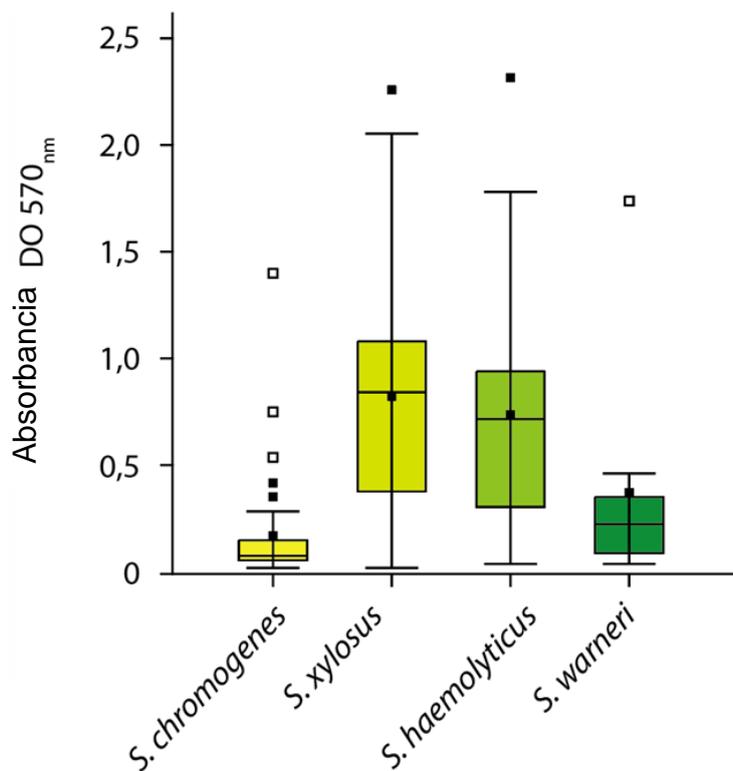


Figura 10. Fuerza del *biofilm* para las especies más prevalentes: *Staphylococcus chromogenes* (n=44), *Staphylococcus xylosus* (n=39), *Staphylococcus haemolyticus* (n=25) y *S. warneri* (n=10). Los puntos fuera de las cajas se consideran valores atípicos.

El hecho de que un alto porcentaje de las cepas pertenecientes a las especies de SCN aisladas con mayor frecuencia sean capaces de formar *biofilm*, es una característica relevante considerando que esta forma de crecimiento protege a la bacteria de las altas concentraciones de antibióticos y de la acción del sistema inmune [Planchon y col.,

2006]. Es importante señalar que el alto porcentaje de cepas formadoras de *biofilm*, detectado en este estudio, posiblemente podría resultar importante en las especies de SCN ambientales para la supervivencia en ambientes secos y pobres en nutrientes. Además, estas cepas en los rodeos lecheros podrían desempeñar un papel en la transmisibilidad, dada la potencial formación de reservorios, por ejemplo, en cañerías de las líneas de ordeño.

III.3.2. Evaluación de la presencia de genes relacionados a principales factores de virulencia de SCN.

III.3.2.1. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a adherencia y formación de *biofilm*

En este estudio se evaluó la presencia de genes asociados a adherencia celular y a formación de *biofilm* entre las 18 cepas de SCN, con diferente capacidad para la formación de *biofilm* de las tres especies más prevalentes, *S. chromogenes*, *S. xylosum* y *S. haemolyticum*.

En la Tabla 11 se detalla el perfil de productos de amplificación a partir del ADN de las cepas de SCN en estudio, utilizando los cebadores y programas detallados en Materiales y Métodos.

Tabla 11. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a adherencia y formación de *biofilm* en cepas de SCN con diferente CFB

Cepas de SCN	Genes asociados a adherencia y biofilm											
	<i>clfA</i>	<i>clfb</i>	<i>fnbpA</i>	<i>fnbpB</i>	<i>icaD</i>	<i>aap</i>	<i>fbe</i>	<i>altE</i>	<i>embP</i>	<i>eno</i>	<i>cna</i>	<i>bap</i>
<i>S. chromogenes</i> * 12-27B	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>S. chromogenes</i> * 18-07	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>S. chromogenes</i> * 25-33	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. chromogenes</i> ^{&} V65	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>S. chromogenes</i> ^{&} V78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>S. chromogenes</i> ^{&} 17-12	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>S. xylosus</i> * 04-33	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>S. xylosus</i> * 05-26	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>S. xylosus</i> [#] 07-05	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>S. xylosus</i> ^{&} 75-22	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>S. xylosus</i> ^{&} 76-34	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>S. xylosus</i> ^{&} 76-04	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-01	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-07	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-33	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 07-41	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 15-23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 15-43	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+

*, no formadoras de biofilm; [&], formadoras de biofilm (I y F); [#], formadoras de biofilm (D); -, presencia no detectada; +, presencia detectada.

La totalidad de las cepas fueron positivas para el amplicón *eno*, este también fue el gen dominante detectado por otros investigadores en aislamientos de origen bovino [Simojoki y col. 2012]. El amplicón *eno* se encontró ampliamente distribuido, independientemente de las especies y de la CFB (100%), por lo tanto, es probable que *eno* no sea un gen específico de *biofilm*.

Los amplicones *aap* y *bap* fueron aislados en un elevado porcentaje (72,2%) en los aislamientos de SCN en estudio, seguidos por *cna* (55,6%) y *fbe* (50%). Sin embargo, la presencia de tres de ellos, *aap*, *cna* y *bap*, se observó en cepas con fuerte capacidad para formar *biofilm* en una proporción muy similar a la encontrada en cepas no formadoras o débil formadoras de *biofilm*. El amplicón *fbe* se detectó aún en mayor proporción en las cepas no formadoras de *biofilm*, dados los resultados, no resultó posible considerar una asociación entre la presencia de estos productos de amplificación y la capacidad de

formar *biofilm*.

Muy pocos aislamientos fueron positivos para los amplicones *icaD*, *altE* y *embP*, sin embargo, el porcentaje de presencia de amplicones *altE* y *embP* entre las cepas analizadas, sugiere una tendencia de asociación positiva entre estos genes y las cepas con fuerte capacidad de formar *biofilm*.

En discordancia con otros investigadores [Simojoki y col., 2012; Khoramrooz y col., 2016; Felipe y col., 2017], los genes *clfA*, *clfb*, *fnbpA* y *fnbpB* no fueron amplificados en ninguno de los aislamientos de SCN analizados, tanto formadores como no formadores de *biofilm*.

Algunos autores han sugerido que los métodos genotípicos y fenotípicos pueden ser utilizados en forma conjunta para determinar este factor de virulencia en un aislamiento bacteriano [Vasudevan y col., 2003, Dhanawade y col., 2010]. Sin embargo, existen, como se demostró, resultados contradictorios entre pruebas fenotípicas y presencia de genes asociados a adherencia y *biofilm*, lo cual sugiere que no hay una correlación entre ambos métodos.

Los resultados obtenidos en este estudio, al igual que los obtenidos por otros investigadores [Simojoki y col., 2012, Tremblay y col., 2013; Felipe y col., 2017; Srednik y col 2017] no revelan marcadores genéticos específicos usualmente atribuidos a la formación de *biofilm* en *S. aureus* [Vasudeman y col., 2003; Darwish y Asfour, 2013; Castro Melo y col., 2013; Khoramrooz y col., 2016; Felipe y col., 2017], en aislamientos de SCN asociados con vacas lecheras. Resulta poco probable que la formación de *biofilm* en las especies del SCN ocurra debido a la presencia de un único componente y/o proceso, como también ha sido sugerido por otros investigadores [Rodriguez y col., 2010; Zmantar y col., 2010].

III.3.2.2. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE (*sea-see*)

Con la finalidad de investigar otras características patogénicas en las 18 cepas de SCN analizadas, se buscó detectar por PCR la presencia de los amplicones atribuibles a los genes que codifican para cinco enterotoxinas estafilococales clásicas: SEA, SEB, SEC, SED y SEE.

Brevemente, a partir del ADN extraído de las cepas control y las 18 cepas en estudio se realizó la amplificación mediante PCR de los fragmentos específicos para los genes *sea*,

seb, *sec*, *sed* y *see*. Los cebadores específicos y los programas de amplificación descritos en Materiales y Métodos permitieron amplificar con éxito los genes de las diferentes enterotoxinas. La figura 11 muestra luego de la electroforesis en geles de agarosa al 2%, los amplicones obtenidos cuando el ADN de las cepas de referencia productoras de enterotoxinas A, B, C, D, y E fueron usados como templado para las PCR. El tamaño de los amplicones correspondientes a los genes de las diferentes enterotoxinas fueron idénticos a los tamaños informados en las citas bibliográficas y que se detallan en la Tabla 7 [Johnson y col., 1991; Mello y col., 2016; Leke y col., 2017].

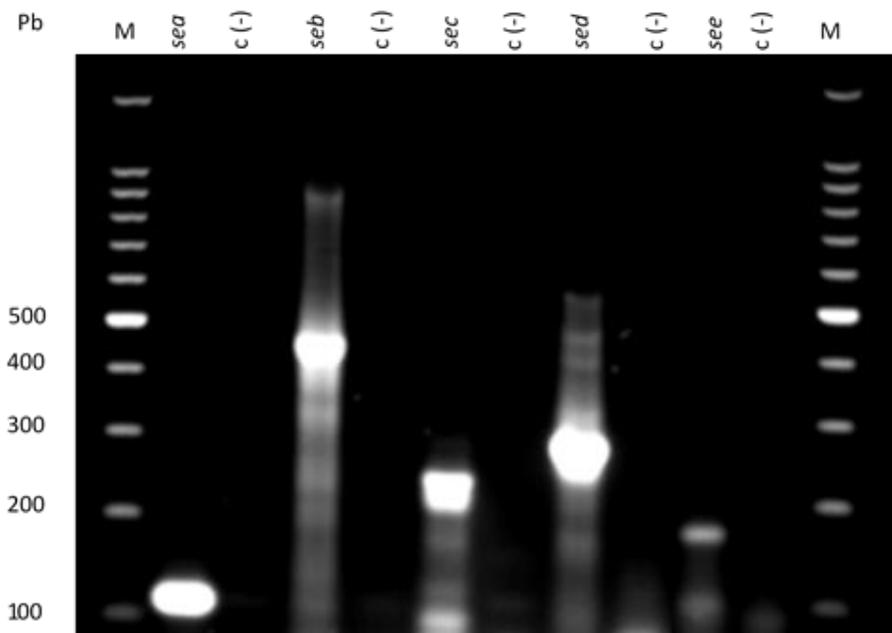


Figura 11. Detección por PCR de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see*, en cepas de referencia. Calle 1 y 12: marcador de peso molecular, 100 pb; calle 2: gen *sea* (120 pb) detectado en *S. aureus* FRI 196E; calle 4: gen *seb* (478 pb) detectado en *S. aureus* Inta 07-487; calle 6: gen *sec* (257 pb) detectado en *S. aureus* Inta 05-684; calle 8: gen *sed* (317 pb) detectado en *S. aureus* FRI 196E; calle 10: gen *see* (170 pb) detectado en *S. aureus* Inta 05-543; lanes 3, 5, 7, 9 y 11: controles (-).

El análisis de las 18 cepas de SCN pertenecientes a las 3 especies aisladas con mayor prevalencia de IIM bovinas, permitió detectar por PCR la presencia de productos de amplificación relacionados a enterotoxinas en 16 de ellas (88,8%), de las cuales 93,8% llevaban más de un amplicón (Tabla 12). El alto porcentaje de muestras positivas para alguno de los genes en estudio coincide con lo observado mundialmente por otros

investigadores en aislamientos de SCN provenientes de leche de vaca en los cuales obtuvieron 40% [Únal y Cinar, 2012], 58,6% [Rall y col., 2014], 74,7% [de Freitas Guimarães y col., 2013] y 82% [Mello y col., 2016], aislamientos de leche de oveja 62,5%, [Martins y col., 2017] y en un porcentaje menor (26,2%), pero no por ello menos importante, en aislamientos de leche de cabra [Rall y col., 2010].

Tabla 12. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a genes que codifican para enterotoxinas estafilococales (Ses) en cepas de *S. chromogenes*, *S. xylosum* y *S. haemolyticus*

Cepas de SCN	Presencia de:				
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>
<i>S. chromogenes</i> * 12-27B	+	-	+	+	-
<i>S. chromogenes</i> * 18-07	+	-	+	+	+
<i>S. chromogenes</i> * 25-33	+	-	+	+	-
<i>S. chromogenes</i> ^{&} V65	+	-	-	+	+
<i>S. chromogenes</i> ^{&} V78	+	-	+	+	+
<i>S. chromogenes</i> ^{&} 17-12	-	-	-	-	-
<i>S. xylosum</i> * 04-33	+	+	+	+	-
<i>S. xylosum</i> * 05-26	+	+	+	-	-
<i>S. xylosum</i> [#] 07-05	+	-	+	+	-
<i>S. xylosum</i> ^{&} 75-22	+	-	+	-	-
<i>S. xylosum</i> ^{&} 76-34	+	-	+	-	-
<i>S. xylosum</i> ^{&} 76-04	-	+	+	+	+
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-01	+	-	+	+	-
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-07	+	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-33	+	-	+	-	-
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 07-41	+	-	+	-	-
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 15-23	+	+	+	+	-
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 15-43	-	-	-	-	-

*, no formadoras de biofilm; [&], formadoras de biofilm (I y F); [#], formadoras de biofilm (D); -, presencia no detectada; +, presencia detectada.

Entre los genes encontrados, el amplicón *sea* fue el más prevalente, estando presente solo o concomitantemente con otro gen de enterotoxina en 15 cepas de las 18 estudiadas (83,3%). El amplicón *sec* presente en 14 cepas (77,7%) fue el segundo gen de toxina

más encontrado, seguido de *sed* en 10 cepas (55,5%). En otros trabajos los genes *sea* y *sec* respectivamente también estuvieron entre los más prevalentes en aislamientos de SCN obtenidos a partir de diferentes ganados lecheros con mastitis, 72% y 34,7% [Freitas Guimarães y col., 2013], 43,8% y 10% [Rall y col., 2014], 50% y 13,4% [Martins y col. (2017)].

La mayor prevalencia de los amplicones *sea* y *sec* observada tanto en este estudio como en estudios llevados a cabo por otros investigadores podría ser el resultado de la fácil diseminación entre cepas de *Staphylococcus* spp. de estos determinantes genéticos que son portados por un profago, en el caso del gen *sea* [Borst y Betley, 1994] o por islas de patogenicidad, en el caso del gen *sec* [Baba y col., 2002; Holtfreter y Broker, 2005].

III.3.2.2.1. Asociación entre la presencia de productos de amplificación relacionados a genes de enterotoxinas y el crecimiento bacteriano en *biofilm*

Se evaluó la asociación de este factor de virulencia con la CFB y se obtuvo que un elevado porcentaje de cepas que revelaron presencia de amplicones de enterotoxinas, estuvieron asociadas con una fuerte capacidad de formar *biofilm* (77,8%) (Tabla 12). El porcentaje de cepas positivas para la presencia de los amplicones *sea*, *sec* y *sed* fue superior a los valores encontrados para la presencia de los amplicones *seb* y *see* (Tabla 13).

Tabla 13. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a genes que codifican para enterotoxinas estafilococales (SEs) en cepas de *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. haemolyticus* formadoras de *biofilm* (I y F).

Especie	Presencia de:				
	<i>sea</i> (%)	<i>seb</i> (%)	<i>sec</i> (%)	<i>sed</i> (%)	<i>see</i> (%)
<i>S. chromogenes</i> (n=3)	2	0	1	2	2
<i>S. xylosus</i> (n=3)	2	1	3	1	1
<i>S. haemolyticus</i> (n=3)	2	1	2	1	0
Total (n=9)	6 (66,7)	2 (22,2)	6 (66,7)	4 (44,4)	3 (33,3)

Por otro lado, la presencia de amplicones *sea-see* también fueron detectados y aún en mayor porcentaje en aquellas cepas que presentaron una débil o nula capacidad para formar *biofilm* (Tabla 14).

Tabla 14. Detección por PCR de productos de amplificación relacionados a genes que codifican para enterotoxinas estafilococales (SEs) en cepas de *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. haemolyticus* no formadoras de *biofilm* y formadoras de *biofilm* (D).

Especie	Presencia de:				
	<i>sea</i> (%)	<i>seb</i> (%)	<i>sec</i> (%)	<i>sed</i> (%)	<i>see</i> (%)
<i>S. chromogenes</i> * (n=3)	3	0	3	3	1
<i>S. xylosus</i> * (n=2)	2	2	2	1	0
<i>S. xylosus</i> # (n=1)	1	0	1	1	0
<i>S. haemolyticus</i> # (n=3)	3	0	2	1	0
Total (n=9)	9 (100)	2 (22,2)	8 (88,9)	6 (66,7)	1 (11,1)

*, no formadoras de *biofilm*; #, formadoras de *biofilm* (D)

Estos resultados resaltan la importancia de este factor de patogenicidad ya que no se puede restar importancia a la relación entre la presencia de estos amplicones en cepas con importante CFB, ya que esta capacidad también les confiere mayor permanencia en relación a superficies inertes como en la línea de leche.

El elevado porcentaje de cepas con capacidad de producir enterotoxinas entre los aislamientos de SCN provenientes de tambos de una de las principales cuencas lecheras del país sumado al crecimiento en *biofilm* representa un riesgo potencial en términos de salud pública.

Dado que el crecimiento en *biofilm* reduce la efectividad de los sanitizantes usados en la industria [Mah, 2012; Simoes, 2010], favoreciendo la permanencia de las bacterias en el ambiente de procesamiento de alimentos por el tiempo suficiente, lo cual les permite alcanzar una concentración bacteriana óptima para la producción de toxinas por aquellas cepas enterotoxigénicas [Adesiyun y col., 1998]. La termotolerancia de estas toxinas ocasiona su permanencia en los productos lácteos contaminados aún luego del proceso de pasteurización [Silva y col., 2013], con el riesgo potencial de producir intoxicaciones alimentarias. Esta situación es una señal de alerta ya que fallas en el proceso de pasteurización de los materiales crudos, combinadas con falta de aplicación de las buenas prácticas de manufactura en los productos lácteos y la capacidad de formar *biofilm* por cepas con capacidad de producir enterotoxinas representa un riesgo para la salud del consumidor [Silva y col., 2013].

Los resultados obtenidos en este estudio valorizan la importancia de estudiar el

potencial toxigénico en este grupo bacteriano por su implicancia en la salud pública y refuerza la eficacia de contar con estrictos programas de higiene que aseguren las prácticas de ordeño y la salud animal.

III.3.2.3. Determinación de perfiles genéticos de resistencia a β -lactámicos

Dado que la resistencia a β -lactámicos puede deberse principalmente a la síntesis de proteínas codificadas por los genes *blaZ* y *mecA*, enzimas β -lactamasa y PBP2a [Odd y Maeland, 1997; Vignoli y Seija, 2008, Soares y col., 2012], respectivamente, se analizaron los perfiles genéticos de resistencia en las cepas de interés.

Se obtuvo ADN cromosomal según el método descrito por Pospiech y Neumann (1995) y se usó como templado en la reacción de amplificación por PCR, utilizando los pares de cebadores correspondiente a los genes *blaZ* y *mecA*. Se amplificaron exitosamente, los fragmentos de 517 pb y 533 pb, respectivamente, como lo describe la bibliografía [Sawant y col., 2009] (Figuras 12 y 13).

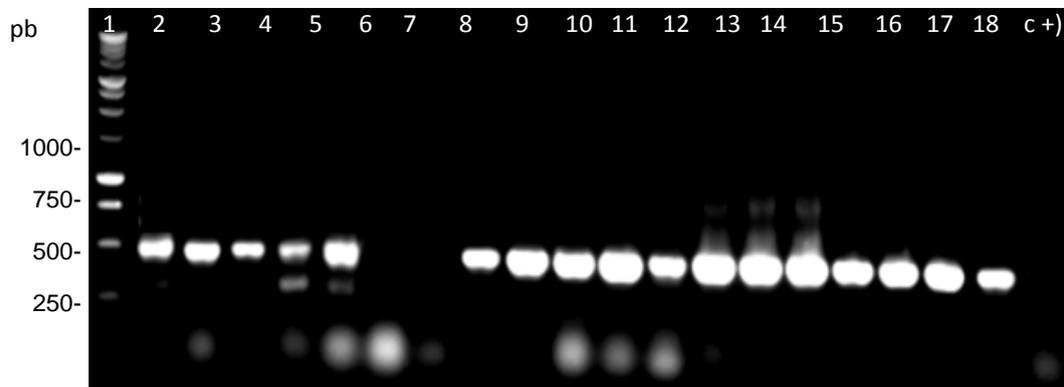


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de 517 pb del gen *blaZ* en cepas de SCN. M: Marcador de PM 1 kb (Promega); 1-6: cepas de *S. chromogenes*, 7-12: cepas de *S. xylosus*; 13-18: cepas de *S. haemolyticus*; c(+): *S. aureus* ATCC 43300 control (+); c(-): control(-)

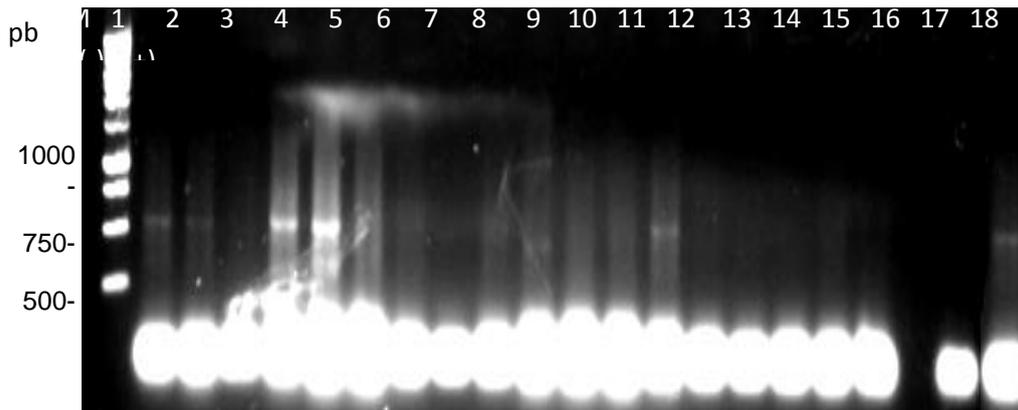


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de 533 pb del gen *mecA* en cepas de SCN. M: Marcador de PM 1 kb (Promega); 1-6: cepas de *S. chromogenes*, 7-12: cepas de *S. xylosus*; 13-18: cepas de *S. haemolyticus*; c(+): *S. aureus* ATCC 43300 control (+); c(-): control(-)

La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos a partir de las amplificaciones de los genes *mecA* y *blaZ* en cepas de SCN Oxacilina y/o Amp/Pen resistentes, pertenecientes a las especies más prevalentes y con diferentes capacidades para formar *biofilm* seleccionadas, los perfiles de resistencia se obtuvieron en trabajos previos del grupo de investigación.

El porcentaje de cepas de SCN que mostró presencia del amplicón *blaZ* fue del 88,9% (Tabla 15). Este resultado es similar al informado por Sampimon y col. (2011) (80,1%) en su estudio de susceptibilidad antimicrobiana de SCN aislados de muestras de leche bovina provenientes de tambos en Países Bajos. Soares y col., (2012) informaron valores algo superiores, este gen fue detectado en el 55% de los SCN aislados de 25 tambos ubicados en el Estado de Río de Janeiro en Brasil.

Tabla 15. Detección de productos de amplificación asociados a los genes *blaZ* y *mecA* en cepas de SCN y patrón de resistencia frente a β -lactámicos, con diferente capacidad para formar *biofilm*

Cepas de SCN	Presencia de amplicones:		Patrón de resistencia:	
	<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	Amp/Pn	Oxacilina
<i>S. chromogenes</i> * 12-27B	+	+	R	R
<i>S. chromogenes</i> * 18-07	+	+	R	S
<i>S. chromogenes</i> * 25-33	+	-	R	R
<i>S. chromogenes</i> ^{&} V65	+	+	R	S
<i>S. chromogenes</i> ^{&} V78	+	+	R	R
<i>S. chromogenes</i> ^{&} 17-12	-	-	R	S
<i>S. xyloso</i> * 04-33	-	-	S	S
<i>S. xyloso</i> * 05-26	+	-	S	S
<i>S. xyloso</i> [#] 07-05	+	-	R	S
<i>S. xyloso</i> ^{&} 75-22	+	-	R	S
<i>S. xyloso</i> ^{&} 76-34	+	-	R	S
<i>S. xyloso</i> ^{&} 76-04	+	-	S	S
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-01	+	+	R	S
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-07	+	-	R	R
<i>S. haemolyticus</i> [#] 22-33	+	-	R	S
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 07-41	+	-	R	S
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 15-23	+	-	S	S
<i>S. haemolyticus</i> ^{&} 15-43	+	-	S	S

*, no formadoras de biofilm; [&], formadoras de biofilm (I y F); [#], formadoras de biofilm (D); -, presencia no detectada; +, presencia detectada; Amp/Pn: ampicilina/penicilina; R: resistente; S: susceptible.

En cuanto a la presencia del amplicón *mecA*, el porcentaje de SCN que lo amplificaron fue (27,8%), fue algo superior al informado por Sampimon y col., (2011) y Soares y col (2012), 14,1% y 13,8%, respectivamente.

Esta amplia distribución de los amplicones *blaZ* y *mecA* podría deberse al hecho que ambos genes se encuentran en elementos móviles que permiten la transmisión horizontal entre aislamientos de *S. aureus* y SCN [Hanssen y col., 2004]. El gen que

codifica para β -lactamasa (*blaZ*), generalmente está localizado en plásmidos [Shalita y col., 1980], mientras que el gen *mecA* se encuentra en un elemento genético móvil llamado *cassette* cromosomal estafilococal (*SCCmec*) [Ito y col., 2001].

Los resultados obtenidos en este trabajo deben ser tenidos en cuenta dado que la presencia de aislamientos meticilino-resistentes (SCN-MR) en animales agrícolas puede servir como reservorios importantes para la transferencia de genes de resistencia [Sawant y col., 2009; Soares y col., 2012].

Por otra parte, el 16,7% (3/18) de las cepas, una cepa de *S. haemolyticus* y dos cepas de *S. chromogenes* resultaron ser heterogéneamente resistentes a la oxacilina (Tabla 13), lo cual se da cuando sólo unas pocas colonias de una población bacteriana pueden expresar resistencia a la oxacilina, siendo esta heterogeneidad más común en cepas de SCN que en cepas de *S. aureus* [Imran y col., 2010; Morosini y col., 2012].

Solamente dos cepas (11,1%), *S. chromogenes* 25-33 y *S. haemolyticus* 22-07, presentaron resistencia a oxacilina y el gen *mecA* no fue detectado. Esto puede atribuirse a otros mecanismos como la inactivación de oxacilina por hiper producción de β -lactamasa, codificada por el gen *blaZ* [Soares y col., 2012].

Una cepa de *S. chromogenes* mostró resistencia a Amp/Pn (ampicilina/penicilina) y el gen *blaZ* no fue detectado, esto puede explicarse por mutaciones en los sitios de unión a los cebadores del gen de resistencia [Haveri y col., 2005]. Deberían tenerse en cuenta en estudios futuros la utilización de otros cebadores u otras estrategias de amplificación.

En el 22,2% (4/18) de las cepas en las que se obtuvieron amplicones atribuibles al gen *blaZ*, dos cepas de *S. xylosus* y dos cepas de *S. haemolyticus*, no se detectó resistencia a Amp/Pn, esto puede deberse a la falta de expresión génica sin inducción, como ha sido descrito también en *S. aureus* [De Oliveira y col., 2000].

Las especies de SCN provenientes de leche bovina difieren en los perfiles fenotípicos y genotípicos de resistencia antimicrobiana, de allí la importancia de una correcta identificación y caracterización de los aislamientos de SCN obtenidos en establecimientos lecheros, para ayudar a definir el tratamiento y las decisiones de control sanitario sobre la MB.

En lo referente a una posible asociación entre las cepas productoras de *biofilm* y aquellas no productoras o débilmente productoras con los perfiles de resistencia antimicrobiana, se pudo observar una tendencia en donde la menor resistencia a β -lactámicos podría estar compensada por la protección que ofrece el crecimiento en

biofilm, como ya ha sido reportado en cepas de *S. aureus* [Marques y col., 2017].

III.3.3. Adherencia, internalización y supervivencia intracelular de SCN en la línea celular MAC-T

Considerando la importancia de la colonización celular, se evaluó la capacidad de adherencia, internalización y supervivencia intracelular entre diferentes especies dentro del heterogéneo grupo de los SCN. Se estudiaron estas capacidades en cepas de las 3 especies en estudio, y dentro de cada grupo se investigó la posible asociación de adherencia, internalización y supervivencia con la mayor o menor capacidad para la formación de *biofilm* de las cepas. Se realizaron triplicados de cada condición evaluada, a su vez en 3 ensayos independientes, para cada cepa en estudio.

El análisis de los datos no mostró diferencias estadísticamente significativas atribuibles a la especie para los 2 primeros parámetros en observación, adherencia e internalización, sin embargo la supervivencia de *S. xyloso* en células MAC-T fue significativamente superior a la observada para *S. chromogenes* y *S. haemolyticus* (Figura 14). La capacidad de adherencia, internalización y supervivencia de la cepa *S. aureus* Newbould 305 utilizada como control positivo, fue estadísticamente superior a la observada para las cepas de las tres especies de SCN analizadas (Figura 14).

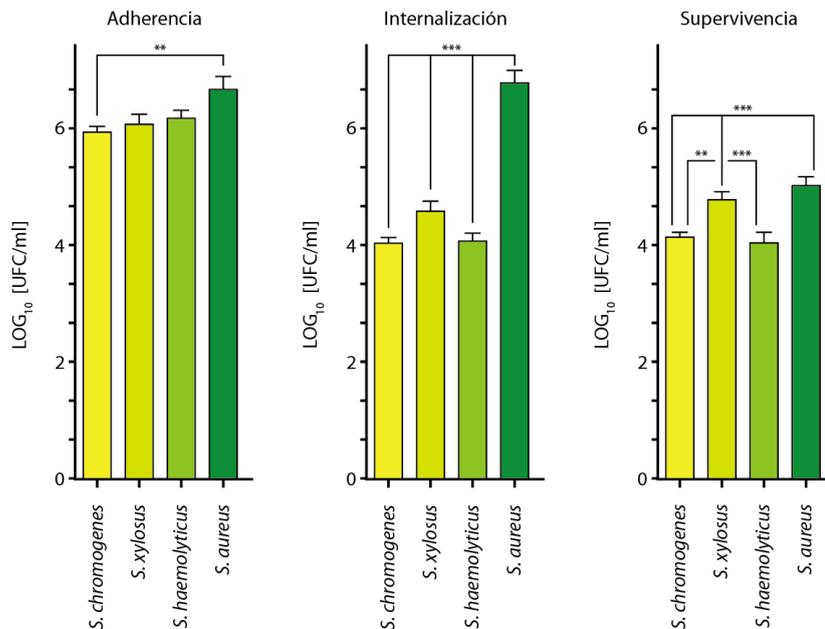


Figura 14. Capacidad de Adherencia, Internalización y Supervivencia en células epiteliales MAC-T para las especies *S. chromogenes*, *S. xyloso* y *S. haemolyticus*. N=6 cepas de cada especie. C (+): *S.aureus*. **: Significancia con $p<0,05$; ***: Significancia con $p<0,01$.

Los resultados obtenidos para los 2 primeros parámetros se compararon con el trabajo realizado por Almeida y Oliver (2001) donde coincidentemente no observan diferencia en la capacidad de adherencia entre 3 especies de SCN analizadas (*S. xylosus*, *S. epidermidis* y *S. hycus*). Sin embargo, ellos si encontraron diferencia respecto a la capacidad de internalización. Por el contrario, el trabajo de Souza y col. (2016) muestra diferencias notorias en ambas capacidades para cepas con diferentes procedencias ecológicas ya sean ambientales (*S. fleurettii*) o adaptadas a la GM (*S. chromogenes*). Hasta nuestro conocimiento la literatura no cita trabajos donde se evalúe la capacidad de supervivencia intracelular de SCN, por lo que los resultados obtenidos en este estudio resultarían novedosos.

III.3.3.1. Asociación entre la capacidad de adherencia, internalización y supervivencia intracelular de SCN en la línea celular MAC-T y la capacidad de formación de *biofilm*

En cuanto a la CFB del total de aislamientos de SCN sin clasificarlos según la especie, no se encontró una relación entre este factor de virulencia y la capacidad de la bacteria de adherirse a las células epiteliales MAC-T ni para sobrevivir en su interior (Figura 15). Sin embargo, aquellas bacterias que presentan una menor CFB mostraron una capacidad de internalizar en las células epiteliales MAC-T significativamente mayor ($p < 0.05$). Resultados similares fueron observados con cepas de *S. aureus* formadoras y no formadoras de *biofilm* y su capacidad para invadir células de epitelio mamario bovino [Oliveira y col., 2011]. Estos resultados indicarían que las cepas que producen *biofilm* invaden a las células epiteliales con menor eficiencia que las cepas que no forman *biofilm*, sugiriendo que aquellas cepas que tiene la capacidad de invadir no utilizarían la formación de *biofilm* para sobrevivir en el huésped.

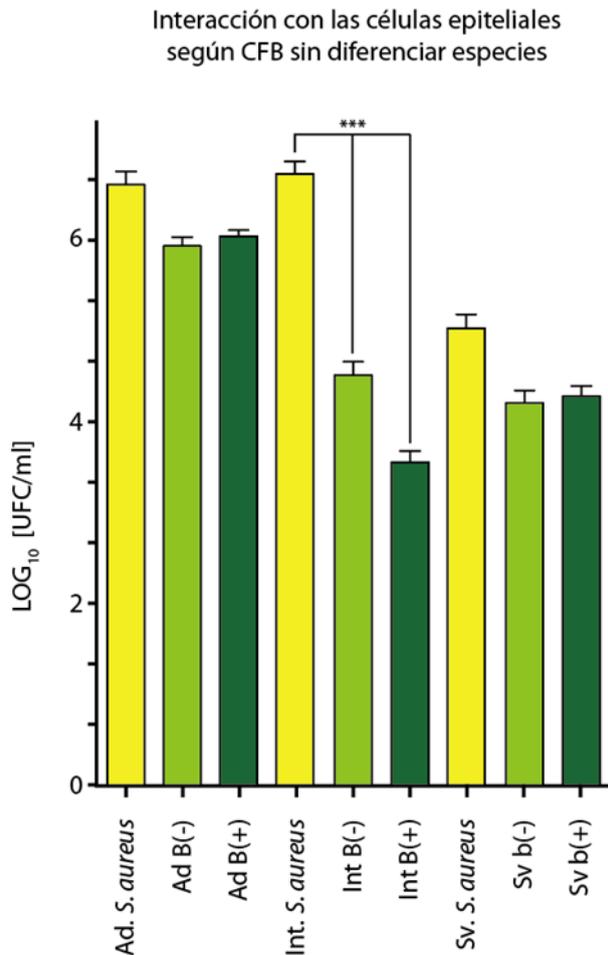


Figura 15: Capacidad de Adherencia (Ad), Internalización (Int) y Supervivencia (Sv) según la capacidad de formación de *biofilm*: Formadoras de *biofilm*: B (+) y No Formadoras de *biofilm*: B (-). N=9 cepas para cada CFB sin diferenciar especie. Control (+): *S. aureus*; ***: Significancia con $p < 0,01$.

Esta tendencia de menor invasividad de las cepas con mayor capacidad de forma *biofilm* también se observó cuando se hizo el análisis entre cepas pertenecientes a las especies *S. chromogenes* y *S. xylosus* (Figura 16). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de bacterias internalizadas entre cepas de *S. haemolyticus* (Figura 15). Esto podría deberse a diferentes mecanismos de internalización de las especies de SCN que hasta la actualidad están en estudio [Josse y col., 2017].

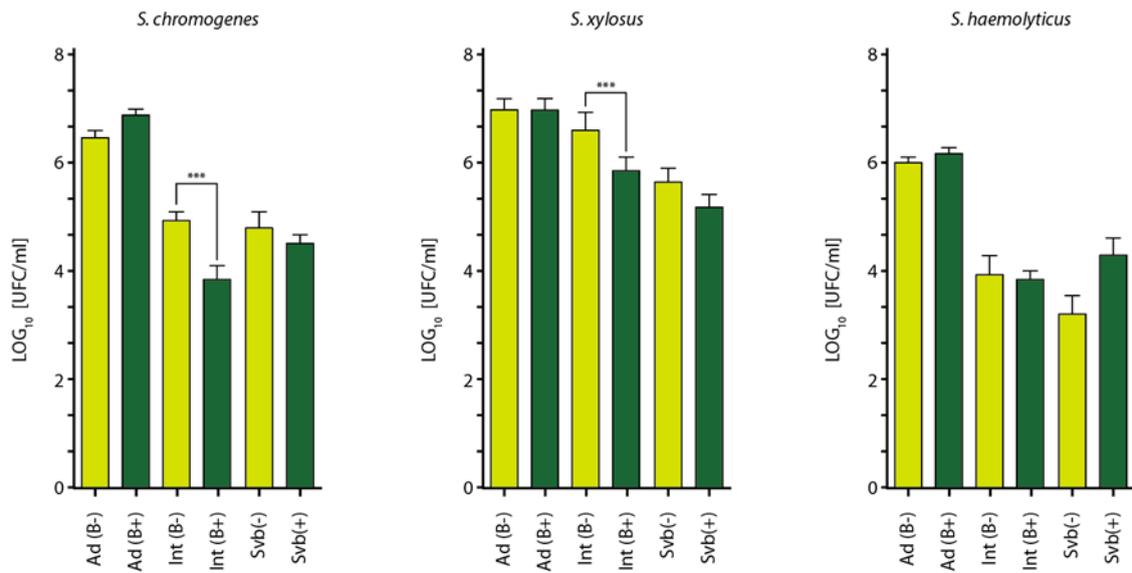


Figura 16. Capacidad de Adherencia, Internalización y Supervivencia para las especies *S. chromogenes*, *S. xylosoy* y *S. haemolyticus*, según capacidad de formación de *biofilm*. N= 3 cepas en cada grupo de formación de *biofilm* para cada especie. **: Significancia con $p < 0,05$; ***: Significancia con $p < 0,01$.

III.4. CONCLUSIONES PARCIALES

- Se observaron diferencias en la formación de *biofilm* de las distintas especies de SCN, siendo *S. xylosum* y *S. haemolyticum* las que presentan mayor capacidad.
- Se describió el perfil genotípico de los principales factores de virulencia, lo que permitió un mayor conocimiento del riesgo potencial que representan las IIM a SCN tanto para la salud animal como humana.
- Se encontró diferencia significativa en la capacidad de supervivencia a nivel intracelular de *S. xylosum*, siendo el primer aporte que describe esta capacidad en las distintas especies de SCN.
- Las cepas que presentaron menor capacidad de formar *biofilm* mostraron una mayor capacidad de internalizar en las células epiteliales MAC-T.

**Mecanismo de
respuesta inmune
de la glándula
mamaria bovina**

IV

IV.1. INTRODUCCIÓN

IV.1.1. Prevención de mastitis por *Staphylococcus coagulasa negativos*

La vacunación es una estrategia común y fácil para el control de enfermedades infecciosas. En los últimos tiempos se realizaron avances significativos en la obtención de antígenos vacunales, mediante técnicas de extracción y purificación de compuestos, y síntesis de proteínas recombinantes, combinados a moléculas transportadoras para generar una respuesta inmune óptima [Gerdtz y col., 2013]. La asociación de antígenos a compuestos adyuvantes o inmunoestimulantes, tiene la finalidad de modular en forma eficiente una respuesta inmune apropiada [Reed y col., 2009]. A pesar de los avances en los últimos años, la MB aún continúa siendo una patología difícil de abordar mediante la vacunación, siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias de inmuno-intervención.

Como se ha descrito en este trabajo, la formación de *biofilm* es el factor de virulencia principalmente asociado a la cronicidad de las infecciones y a la resistencia bacteriana a la fagocitosis [Consterton y col., 1999; Kampen y col., 2005]. Por esta razón muchos estudios buscan desarrollar terapias dirigidas a los componentes de estas biopelículas. En humanos se han propuesto antígenos vacunales dirigidos al componente polisacárido del *biofilm* estafilocócico PNAG en *S. aureus*, el análogo al componente PIA en SCN, obteniendo resultados positivos [Maira-Litrán y col., 2005]. Este tipo de antígenos purificados podrían ser utilizables en humanos, pero sería imposible aplicarlos para mastitis estafilocócicas en rumiantes por su mala relación costo-beneficio [Prenafeta y col., 2010]. Fueron propuestas varias estrategias de vacunación para mastitis estafilocócicas en rumiantes dirigidas tanto a componentes constitutivos bacterianos, como a las biopelículas. Algunas de estas propuestas, incluso fueron similares a la que se propone en este trabajo, con extractos bacterianos crudos en Hidróxido de Aluminio [Calzolari y col., 1997; Giraud y col., 1997]. Todos estos mostraron una degradación rápida de la respuesta protectora frente a la mastitis.

Según la literatura, las principales metas de la vacunación frente a esta enfermedad serían obtener inflamación reducida en el sitio de inoculación, partir de un inóculo bacteriano con buena relación costo-beneficio, y la obtención de parámetros inmunológicos que pudieran ayudar a predecir el éxito en dicha vacunación

[Prenafeta y col., 2010].

IV.1.2. *Biofilm* de SCN

Los SCN se diseminan ampliamente en el medio ambiente, colonizando nichos ecológicos específicos, donde generalmente desarrollan una relación benigna con sus huéspedes [Otto, 2009]. Sin embargo, también son patógenos oportunistas por ser agentes causantes de una amplia gama de infecciones [Vadyvaloo y Otto 2005]. La persistencia en el huésped y la evasión de la respuesta inmune son las estrategias patógenas empleadas por estas bacterias, que se logran principalmente por su sorprendente capacidad para formar biopelículas gruesas y de múltiples capas [Otto, 2008]. Curiosamente, se ha propuesto que la producción de biopelículas también es esencial en un entorno como la piel (estudio realizado en humanos), donde los SCN están expuestos a un estrés mecánico extenso [Otto, 2009]. La mayor parte del conocimiento sobre la formación de biopelículas de este grupo bacteriano (SCN) se deriva esencialmente de estudios sobre *Staphylococcus epidermidis*. Los marcadores extracelulares de estafilococos relacionados con la producción de limo o *biofilm* se han investigado intensamente en las últimas décadas, y se utilizó *S. epidermidis* RP62A (ATCC 35984), que se considera una cepa de referencia positiva para *biofilm*, como una cepa modelo preferencial para estos estudios realizados por varios autores [Christensen y col., 1990; Mack y col., 1999]. En el trabajo de Heilmann y col. (1996) identificaron el operón biosintético de esta adhesina polisacárida y la denominaron *ica*. Más tarde, se identificó un locus genético similar en los aislamientos clínicos de *S. aureus* [McKenney y col., 2000].

Además de la PIA, se han identificado otros factores que median la acumulación de biopelículas, especialmente la proteína asociada a la acumulación (Aap) [Rhode y col., 2005], un homólogo de la proteína asociada al *biofilm* *S. aureus* (Bap), llamada Bhp [Tormo y col., 2005], y la proteína de unión a la matriz extracelular (Embp) [Christner y col., 2010]. Por lo tanto, está claro que las diferentes moléculas juegan un papel importante en la fase acumulativa de la formación de biopelículas de *S. epidermidis* [Schommer y col., 2011]. Ha quedado claro que la PIA no es un componente esencial ni necesariamente el componente principal de los *biofilm* de SCN [Frank y col., 2007; Kogan y col., 2006]. La adhesión intercelular mediada por la proteína asociada a la acumulación [Aap] antes nombrada, independientemente o en cooperación con el

operón *ica*, está bien descrita [Hussain y col., 1997; Klingenberg y col., 2007; Rhode y col., 2005]. También se ha sugerido que los componentes adicionales, tales como proteínas distintas de Aap, ADN y ARN y polisacáridos distintos de PIA [Hussain y col., 1997; Qin y col., 2007; Sadovskaya y col., 2005; Tormo y col., 2005.], son importantes en las biopelículas de SCN Para *S. epidermidis* se ha demostrado que el ADNe es especialmente importante en las fases iniciales de la formación de biopelículas [Qin y col., 2007].

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1. Cepas bacterianas

Cepas de campo: partiendo originalmente de una colección de 118 cepas de SCN pertenecientes a los grupos de investigación, originalmente aisladas de muestras de leche de GM de bovinos de tambos en la cuenca lechera de Villa María, provincia de Córdoba [Dieser y col., 2014; Raspanti y col., 2016; Felipe y col., 2013, Somale y col., 2013, Felipe y col., 2017] se trabajó con las 18 cepas seleccionadas y descritas en los capítulos previos según sus factores de virulencia principales, y siendo representantes de las especies más prevalentes en la zona.

Se seleccionó una cepa de la especie *S. xylosus* 222 por destacarse en su capacidad de inducción de respuesta inmune en el modelo *in vitro* y fue la seleccionada para obtener el inmunógeno probado *in vivo* en este capítulo.

IV.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo (Britania) se prepararon según las recomendaciones del fabricante en cada caso.

Caldo Trypticase Soya (TSB): 30 gr/L de tripteina soya caldo.

Agar Trypticase Soya (TSA): A la preparación anterior se adicionó agar-agar (Britania), a razón de 15 gr/L y 6 gr/L de extracto de levadura (Britania).

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C, excepto el medio de cultivo celular (DMEM) que fue esterilizado por filtración.

IV.2.3. Reactivos, enzimas y soluciones stock

Las drogas utilizadas fueron de grado analítico de las marcas Promega, Invitrogen y Sigma.

IV.2.3.1. Respuesta inmune

IV.2.3.1.1. Inmunoensayo enzimático

- Kit Comercial ELISA (Thermo Scientific) IL-1 β Kit Comercial ELISA (Thermo Scientific) IL-6 Agua destilada.
- PBS pH 7.4-
- Buffer carbonato/bicarbonato (CB) 0, 2 μ M pH 9.4. Para preparar 200 mL: Na₂CO₃ 0,2014 g + NaHCO₃ 0,6804 g + agua destilada filtrada 200 mL, conservar en freezer -20 °C, corroborar pH antes de cada uso.
- Buffer de bloqueo: PBS/4 % leche en polvo descremada Buffer de lavado: PBS/0,05% Tween pH 7.4 (preparar fresco) Diluyente: PBS/2 % leche en polvo descremada.

IV.2.3.2. Caracterización de la composición de *biofilm*.

- Solución Salina (NaCl 0,9%).
- Meta-periodato sódico 40mM (NaIO₄) Proteinasa K.
- Tris HCL (100 mM: NaCl pH 7,5).
- DNAsa I Genbiotech MgCl₂ 5mM.
- Cristal violeta 0,1%.

IV.2.3.3. Ensayo *in vivo*

- Animales:
-40 vaquillonas Holstein en su 3er trimestre de gestación
-3 Vacas Holstein.
- Quitosano (Sigma-Aldrich).
- Hidróxido de Aluminio (Biopack).

IV.2.4. Instrumentos y descartables

Lector de micro placas (Labsystems Multiskan), micro placas.

Erlenmeyer, tubos de ensayo con tapa, ansas en rulo, placas de Petri, gradillas para tubos de ensayo, tubos tipo kahn, gradillas para tubos tipo kahn, tubos Eppendorff, gradillas para Eppendorff, pipetas con tips (p10, p100, p200, p1000, p5000).

Balanza electrónica, vortex, mechero de Bunsen, Densicheck, heladera con freezer, campana de flujo laminar, baño termostatzado, estufa de cultivo, microondas, autoclave

IV.2.5. Condiciones generales de cultivo

Se realizaron cultivos planctónicos en tubos con 5 mL de TSB y se incubaron a 37°C por 16 hs para obtener cultivos en fase logarítmica. Para cultivos en *biofilm* se inoculó, a partir de un cultivo O/N, 200 µL por pocillo en una placa de micro titulación y se incubaron a 37°C por 16 hs.

IV.2.5.1. Conservación de las cepas

A partir de una suspensión de 1 o 2 colonias, aisladas en cultivo puro, se sembró en 5 mL de TSB y se incubó 16 hs en estufa de cultivo hasta fase exponencial, se suplementó con glicerol estéril a una concentración del 20% para su posterior conservación en crio tubos a -80°C.

Para su posterior uso las bacterias fueron reactivadas mediante siembra en placas de TSA e incubadas en estufa a 37°C por 24 hs.

IV.2.6. Evaluación de la respuesta inmune.

Se evaluó la respuesta inmune de las células MAC-T inducida por las interacciones con las distintas cepas de SCN en los sobrenadantes recuperados del ensayo de interacción descrito en el apartado Materiales y Métodos del capítulo III de este trabajo (III.2.8.2).

IV.2.6.1. Ensayo inmuno-enzimático (ELISA)

La concentración de IL-1β e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo celular, fueron determinadas por ELISA (Thermo Scientific), según las recomendaciones del fabricante. Para ello, placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con anticuerpo de captura anti-IL-1β o anti IL-6 para cada caso, diluido 1/100 en buffer

carbonato/bicarbonato (0,2 μ M; pH 9,4) durante toda la noche a 4°C. Las placas fueron lavadas y bloqueadas con buffer de bloqueo durante 1 h a 37°C. Se sembraron las muestras y se incubaron las placas toda la noche a 4°C. Transcurrido ese tiempo se realizó una segunda incubación a 37°C por una hora. Posteriormente las placas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo de detección biotinilado anti-IL-1 β o anti IL-6 según correspondiera, diluido 1/50 en diluyente durante 2 hs a temperatura ambiente. Después de lavar, se agregó estreptavidina-peroxidasa diluido 1/400 con diluyente y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Las placas fueron lavadas y se colocó 50 μ l de la solución sustrato durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad durante el tiempo necesario. Finalmente se agregó 50 μ l de la solución de frenado y se procedió a la lectura de la DO_{490nm} en lector de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific). De acuerdo a las absorbancias obtenidas para los patrones se construye una curva de calibración que permite calcular la concentración de citoquinas presente en las muestras.

IV.2.7. Caracterización de la composición de *biofilm*

Estos ensayos fueron llevados a cabo siguiendo la metodología de Kogan y col. (2006) y Fredheim y col., (2009) con ligeras modificaciones. Se trabajó con las 9 cepas caracterizadas como fuertes formadoras de *biofilm* en apartados anteriores, tomando 3 representantes de cada una de las especies más prevalentes. Brevemente, se incubaron en placas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One) 200 μ L de inóculo de cada cepa, estandarizado a 0,5 en escala de McFarland, y se incubó a 37°C por 48 hs para así obtener *biofilm* maduros. Los *biofilm* fueron lavados 2 veces con 200 μ L de NaCl 0,9% y luego tratados por 4 hs a 37°C con 200 μ L de metaperiodato sódico (NaIO₄) 40 mM o 200 μ L de proteinasa K (0,1 mg/mL en Tris-HCl: 1mM CaCl₂ 20 mM), a su vez los Wells control se llenaron con NaCl 0,9%.

Luego de los tratamientos, los *biofilm* fueron lavados 1 vez más con 200 μ L de NaCl 0,9%. Los tratados con proteinasa K fueron teñidos por el método de cristal violeta descrito en el apartado correspondiente a CFB, y se midió su DO_{570nm} en el lector de microplacas Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific). Por otro lado, aquellos tratados con metaperiodato sódico fueron resuspendidos en NaCl 0,9%, disgregados por sonicación, y luego se midió su DO_{620 nm}. Se tomó esta determinación porque la bibliografía citada describe que este compuesto reacciona de manera

inespecífica con el cristal violeta, pudiendo arrojar resultados falsos positivos (Onicuc y col., 2016). Se agruparon los resultados en 3 categorías según el porcentaje de disrupción de *biofilm* en comparación con los no tratados, de la siguiente manera: (i) No Desprendimiento (-10%) (ii) Desprendimiento intermedio (10-49%) y (iii) Desprendimiento Fuerte (+50%).

IV.2.8. Evaluación de la respuesta inmune de la cepa elegida en diferentes tiempos y fracciones.

Teniendo en cuenta la exacerbada respuesta de la cepa *S. xylosus* 222 en comparación a las demás en estudio, fue tomada como la de elección para los ensayos siguientes. Se realizaron ensayos de interacción con células MAC-T para medir en qué tiempo y qué fracción del cultivo bacteriano generaba esta mayor respuesta. Para esto se enfrentó de la misma forma el cultivo bacteriano ajustado a 0,5 en escala de McFarland a los tiempos de 2, 6, 12 y 24 hs.

Se obtuvieron distintas fracciones de cultivo bacteriano de *S. xylosus* 222, para ello se realizó un cultivo de *S. xylosus* 222 en forma planctónica, ajustando el inóculo 0,5 de la escala de McFarland. Por otro lado, se cultivó la cepa *S. xylosus* 222 hasta obtener un *biofilm* maduro (48 hs a 37°C en TSB en cultivo estático), ambos cultivos fueron colectados en tubos cónicos, centrifugados y separados en 2 fracciones: sobrenadantes y precipitados o pellets. Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración con filtros de 0,22 micras y resuspendidos en solución fisiológica 0,9%. Los precipitados fueron disgregados por sonicación y se indujo la muerte celular por shock térmico. Esta consistió en someter el lisado a 3 ciclos de frío/calor (10' -80°C y 10' a 65°C en baño térmico).

Se obtuvieron cuatro fracciones de estudio a partir del inóculo de *S. xylosus* 222: sobrenadante de cultivo planctónico y en *biofilm* (SNP y SNB) y precipitado muerto del cultivo planctónico y en *biofilm* (PP y PB). De las 4 fracciones obtenidas se tomaron alícuotas, se sembraron a fin de comprobar la muerte celular y esterilidad de los mismos, luego fueron liofilizadas y almacenadas hasta el momento del ensayo. Las alícuotas fueron resuspendidas en medio de cultivo celular DMEM a una concentración de 1×10^9 UFC/mL para ser enfrentadas a la línea celular MAC-T como se describió en ensayos anteriores. Para ello, se enfrentaron las distintas fracciones ajustadas a 0,5 en escala de McFarland a los tiempos de 2, 6, 12 y 24 hs. Los sobrenadantes de los cultivos

celulares obtenidos fueron procesados mediante la técnica de ELISA para evaluar la producción de las citoquinas IL-6 e IL-1 β en cada caso, como se describió en el apartado IV.2.6.1., donde se explica esta técnica para cuantificar niveles de citoquinas.

IV.2.9. Ensayo *in vivo*

Diseño experimental de ensayos con vaquillonas en estancia Yucat

IV.2.9.1. Animales

Se utilizaron 3 vacas y 40 vaquillonas Holstein, pertenecientes al rodeo experimental de la Estancia Yucat en la ciudad de Villa María, los cuales se encontraron libres de infección microbiana a la observación clínica. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigaciones Agropecuarias y Enseñanza (Federation of Animal Science Societies, FASS, 1999).

El trabajo consistió en movilizar los animales seleccionados a la manga para la vacunación, para la extracción de sangre y al tambo para la obtención de leche en las instalaciones de ordeño, de acuerdo con las normales y cuidadas prácticas de manejo para evitar los riesgos de salud para los operarios y los animales.

IV.2.9.2. Preparación del inmunógeno.

- Obtención de antígeno enriquecido en la matriz de *biofilm*: Se preparó el inmunógeno a partir de la fracción correspondiente a la matriz de *biofilm* de la cepa seleccionada. Se utilizó una formulación basada en un concentrado inactivado de la matriz del *biofilm* proteico de la cepa de SCN *S. xylosus* 222 previamente caracterizada como altamente virulenta. El mismo se obtuvo por centrifugación de los *biofilm* de la cepa *S. xylosus* 222, inactivada por shock térmico en 3 ciclos de frío calor (10' -80°C y 10' a 65°C en baño térmico) y liofilizada. Luego se resuspendió en solución fisiológica hasta la concentración de 1×10^9 UFC/mL. Se agregó Q en la concentración de 500 ug/mL, o Hidróxido de Aluminio (A) al 20% según sea el grupo de estudio. Estos compuestos no presentan riesgos para la salud humana ni animal. Todos los compuestos luego de preparados, fueron sembrados para comprobar la muerte bacteriana. El contenido total de proteínas fue determinado por el método de Bradford [Bradford, 1976] como otro

método para estandarizar la concentración del inmunógeno.

-Concentración de Q a utilizar: la concentración de Q a utilizar fue determinada en estudios previos realizados por el grupo en colaboración con investigadores del INTA Rafaela [Felipe, 2015]. Mediante un ensayo de Dosis vs Respuesta se determinó que 500 µg/mL del adyuvante Q resultó ser la concentración apropiada para estimular una respuesta inmune sin generar inflamación ni alteraciones en la ubre de las vacas inoculadas [Felipe, 2015].

- Preparación de las formulaciones: las formulaciones a evaluar se desarrollaron a partir de 2 mL del inmunógeno de matriz de *biofilm*, conteniendo el equivalente a 1×10^9 UFC/mL o 100 pg. /mL de proteínas totales. Al mismo se le adiciono los adyuvantes en estudio: como control se adicionó 0,5 mg de Hidróxido de Aluminio y a la formulación de la vacuna en estudio, se le adiciono Q 1 mg. Como control de la inocuidad del adyuvante, se utilizó Q 1 mg.

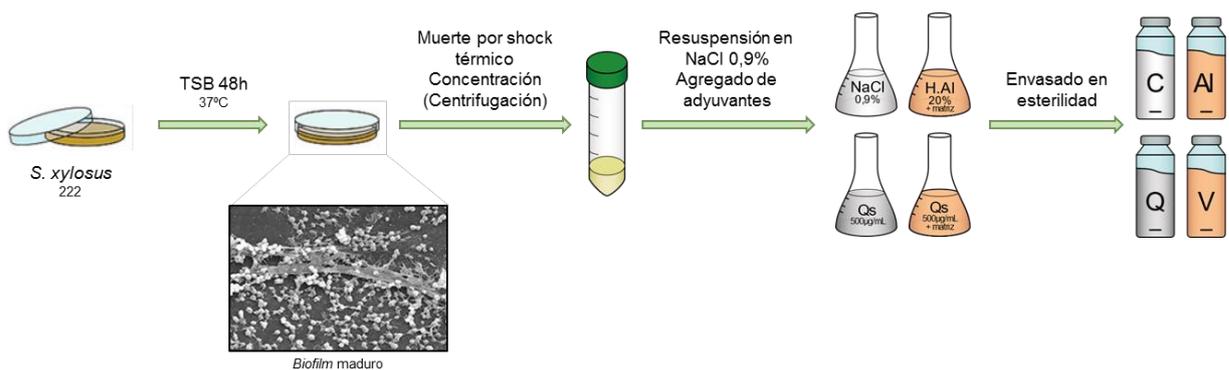


Figura17. Esquema de Preparación del Inmunógeno.

IV.2.9.3. Prueba de Reacción al producto

Se realizó una prueba tomando 3 vacas al azar y se corroboró que no presentaron al examen clínico reacciones adversas como ser abscesos, maculas o inflamación en la zona de aplicación como tampoco síntomas sistémicos (fiebre, malestar, etc.). Para esto se inocularon los animales en la zona de la tabla del cuello, de la misma manera que se describió el protocolo del ensayo, aplicando una dosis del inmunógeno de matriz de *biofilm* con adyuvante Hidróxido de Aluminio, una dosis del inmunógeno de matriz de *biofilm* con el adyuvante Quitosano, y una dosis del control de inocuidad del adyuvante Q, respectivamente a cada uno de los animales en estudio. Se consideró para la aplicación el área de la tabla del cuello, dado que permite una mejor optimización del

esquema por su fácil acceso y practicidad experimental, teniendo en cuenta que este factor puede modificar la respuesta inmune inducida, lo cual se tuvo en cuenta luego para el diseño del esquema de inmunización [Boerhout y col., 2015].



Figura 18. Esquema de inmunización y observación clínica para prueba de reacción al producto

IV.2.9.4. Esquema de inmunización con la matriz del *biofilm* proteico y muestreo

Se desarrolló un modelo experimental en bovinos siguiendo protocolos ya descriptos y donde otras estrategias de vacunación han sido evaluadas [Camussone y col., 2013, 2014], con procedimientos analizados por el comité de Ética y Seguridad de la UNVM y UNRC.

Se utilizaron vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación del tambo comercial del establecimiento Estancia Yucat, Villa María. Antes del comienzo del protocolo, las GM de todos los animales incluidos en el experimento se examinaron clínicamente por palpación y se realizó un examen clínico para descartar la presencia de IIM. Solo se incluyeron en el ensayo a vaquillonas libres de IIM, y sin signos clínicos de inflamación, seleccionándose para este estudio 40 animales. Se recolectó previamente una muestra de sangre por punción de la vena coccígea, lo cual se repitió cada 15 días hasta el día del parto. Luego se aplicó el esquema de inmunización que se describe a continuación, conformando 4 grupos con los animales seleccionados divididos al azar (n=10). Cada uno de ellos recibió una de las siguientes formulaciones:

Grupo Control (C): 2 mL de solución fisiológica estéril (NaCl 0,9%), grupo placebo o no inmunizado.

Grupo Quitosano (Q): 2 mL del adyuvante Q 500 ug/mL.

Grupo Vacuna (V): 2 mL del inmunógeno de matriz de *biofilm* utilizando el adyuvante Q 500 ug/mL, grupo a la que se le aplicó la vacuna en estudio.

Grupo Aluminio (AL): 2 mL del inmunógeno de matriz de *biofilm* utilizando el adyuvante Hidróxido de Aluminio, grupo control de vacunación.

Se aplicaron tres inyecciones subcutáneas en el área de la tabla del cuello, a los 56 y 28 días previos a la fecha estimada de parto, y a los 15 días después, como se detalla en el esquema de vacunación (Figura 19). Dentro de las 24 hs post-parto se tomaron muestras de calostro de cada cuarto mamario, y luego se continuó el muestreo a los 15, 21, y 56 días tomando muestras de sangre y leche para determinación de niveles de anticuerpos específicos anti-*biofilm*. De las muestras de sangre se obtuvo el suero, que fue separado por centrifugación y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras de leche se centrifugaron por 15 min a 10.000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras de sangre se dejaron coagular mediante incubación a temperatura ambiente y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 1.500 rpm por 10 min. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. A partir del tercer mes y hasta el final de la lactancia, se realizaron muestreos de leche de forma mensual, para su análisis bacteriológico.

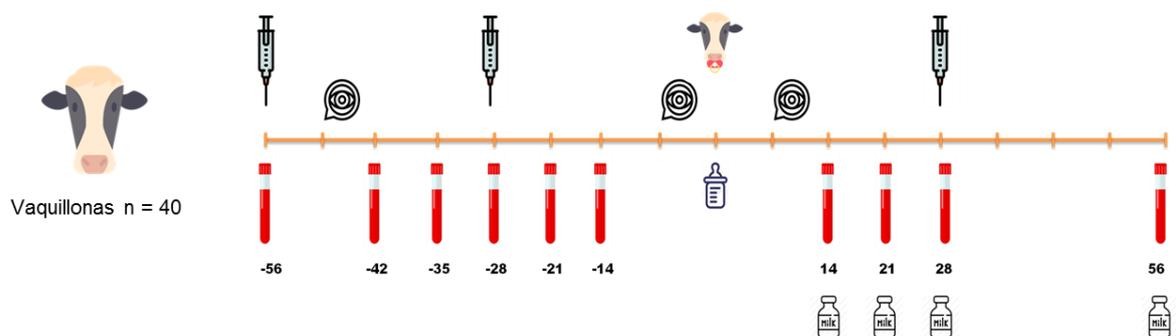


Figura 19. Esquema de Inmunización, observación clínica y toma de muestras de sangre, calostro y leche en función a la fecha estimada de parto.

IV.2.9.5. Determinaciones analíticas

IV.2.9.5.1. Análisis bacteriológico y recuento de células somáticas

El análisis microbiológico y recuento de células somáticas, se realizó en muestras de leche, antes y después de la inoculación en todos los tiempos pos parto. Las muestras se cultivaron sobre placas de agar sangre al 5%, se incubaron durante 24-48 hs y se descartaron los animales que presentaron crecimiento microbiano por ser considerados con IIM. El RCS de cada cuarto individual se realizó mediante autoanalizador Soma-

Count 300 (Bentley Instruments, Estados Unidos) en el Laboratorio LabVima de la ciudad de Villa María, Argentina.

IV.2.9.5.2. Determinación de anticuerpos

Para la determinación de IgG específica para las proteínas de la matriz del *biofilm*, se realizó la técnica de ELISA sensibilizando placas de 96 pocillos con el antígeno 1 ug/well (antígeno enriquecido en la matriz de *biofilm*) durante 16 hs en cámara húmeda a 4°C, posterior bloqueo con solución PBS/leche de cabra al 4%. Luego se incubaron las muestras de sueros diluidos 1/400, leche 1/10 y calostros 1/50 de los grupos en estudio durante 1.30 hs a 37°C posteriormente se añadió un anticuerpo secundario anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa (Sigma) 1/2500 durante una hora. Para determinar isotipos se evaluaron los niveles de IgG2 e IgG1 específica, utilizando anticuerpos monoclonales anti-IgG2 o anti-IgG1 bovina obtenidos en ratón (Serotec) y un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) a la misma dilución. La reacción fue revelada utilizando una solución de sustrato/cromógeno TMB (Pierce) durante 20 min. [Camussone y col., 2013; Gil y col., 2014]. Se tomó como grupo control a aquellos que recibieron placebo, y se consideró como unidad experimental al animal entero y no al cuarto mamario teniendo en cuenta la vía de aplicación. La respuesta de anticuerpos específicos contra el inmunógeno aplicado, fue determinada durante el periodo de estudio en 10 muestras seriadas correspondientes a los días -56, -42, -35, -28, -21, 14, 14, 21, 28 y 56 en relación al parto (Tiempo 0). Se utilizó como control positivo del ensayo la aplicación del inmunógeno con el adyuvante Hidroxido de Aluminio.

IV.2.10. Análisis estadístico

Se utilizaron técnicas de estadística descriptiva univariada y multivariada para la exploración y determinación de la cepa a utilizar como candidata para la búsqueda de posibles antígenos vacunales. Una vez seleccionada la cepa, se realizaron estudios descriptivos de las diferencias en distintos tiempos y fracciones de cultivo bacteriano para optimizar las condiciones del inmunógeno producido.

Para la evaluación de los efectos *in vivo* luego de la inmunización, se llevó a cabo un experimento que se corresponde con un diseño bifactorial con medidas repetidas en el tiempo, donde las unidades de observación fueron vaquillonas de la raza Holstein en el último trimestre de su gestación (N=40). De manera repetida en el tiempo se tomaron muestras de sangre, calostro y leche. Las variables de interés fueron las inmunoglobulinas (Ig) G (IgG), G1 (IgG1) y G2 (IgG2). Los tratamientos aplicados en 4 grupos (N=10) fueron: V (Inmunógeno con Q como adyuvante), AL (Inmunógeno con Hidróxido de Aluminio como adyuvante), y como controles Q (Quitosano) y C (Placebo con NaCl 0,9%). Para determinar diferencias significativas se realizaron modelos lineales generales y mixtos, contemplando la respuesta aleatoria de cada animal como así también la estructura de correlación serial presente en este tipo de ensayos. Para la selección del mejor modelo se utilizaron los criterios de Akaike y el criterio Bayesiano (AIC y BIC). Las diferencias *a posteriori* se determinaron a través del test de medias de la prueba de di Rienzo, Guzmán y Casanovas (DGC) utilizando un nivel de significancia del 5%.

Para el análisis bacteriológico y de RCS los datos recolectados se analizaron utilizando pruebas de independencia chi cuadrado y análisis a través de modelo lineal mixto bifactorial respectivamente $p \leq 0,05$.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Evaluación de la respuesta inmune de células epiteliales MAC-T frente a la infección experimental *in vitro* con SCN mediante la evaluación de la producción de IL-1 β e IL-6

El objetivo de este ensayo fue caracterizar la respuesta inmune innata de células MAC-T infectadas *in vitro* con los aislamientos de las distintas especies de SCN en estudio, clasificados según la CFB. Se midió la concentración de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo empleando la técnica de ELISA y expresados en pg/mL. Los ensayos de infección experimental en células epiteliales MAC-T con las 9 cepas de SCN productoras de *biofilm* en estudio, se llevaron a cabo en iguales condiciones que las planteadas en el ensayo de adherencia, internalización y sobrevivida.

Los primeros ensayos se llevaron a cabo comparando las cepas con mayor CFB (F) y las consideradas D o no formadoras, con las cuales se trabajó en el objetivo anterior. Además, se comparó la respuesta obtenida en dos tiempos de infección, 2 y 24 hs. En la figura 20 puede observarse una mayor respuesta de células MAC-T al ser infectadas con cepas fuertemente productoras de *biofilm*, a las 24 hs pos-infección para la citoquina pro-inflamatoria IL-6 ($p < 0.05$). Cuando evaluamos la respuesta según la especie de SCN que generó la infección, se observó una tendencia de mayor respuesta de IL-6 para *S. xylosum* en el periodo de 24 hs pos-infección (Figura 21). Considerando que a los fines de este estudio nos interesa obtener un inmunógeno a partir de una matriz de *biofilm*, y considerando la mayor respuesta en las cepas que tienen la mayor CFB, destacamos los resultados obtenidos de las cepas consideradas F formadoras de las 3 especies principales en estudio.

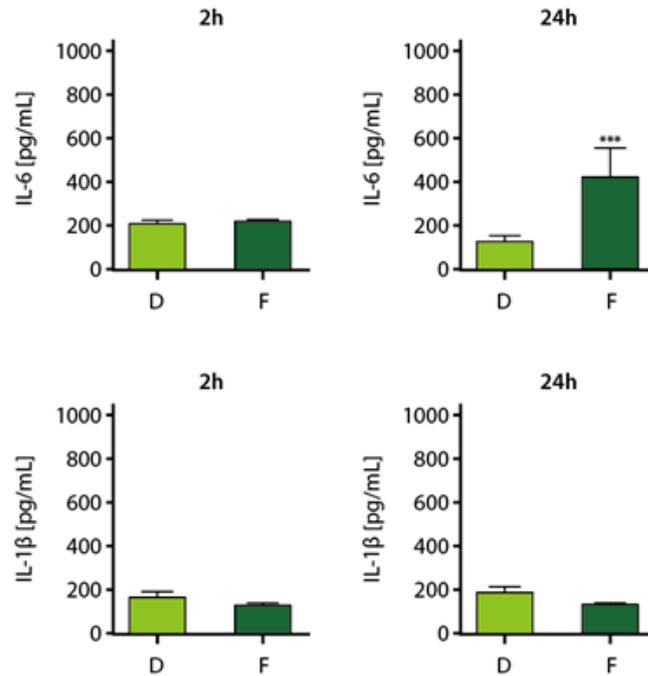


Figura 20. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo celular MAC-T infectadas con aislamientos de SCN con diferente CFB. A y B- niveles de IL-6 en pg. /mL a las 2 y 24 hs de infección, C y D- niveles de IL-1 β en pg. /mL a las 2 y 24 hs de infección. D: débil, F: fuerte. (* $p < 0.05$).

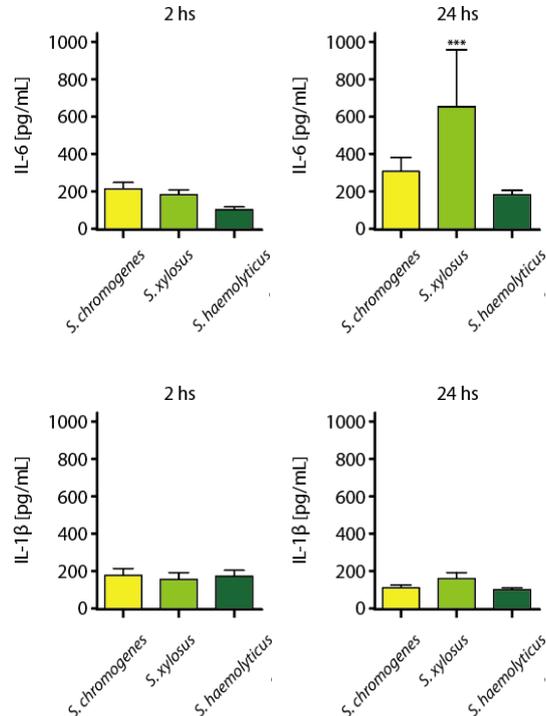


Figura 21. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo celular MAC-T estimulados con diferentes especies de SCN. A y B- niveles de IL-6 en pg. /mL a las 2 y 24 hs de infección, C y D- niveles de IL-1 β en pg. /mL a las 2 y 24 hs de infección: *S. chromogenes*, *S. xylosum*, y *S. haemolyticus*.

Con el propósito de lograr una mejor caracterización de la respuesta inmune inducida en las células epiteliales mamarias, se evaluó el estímulo generado por cada una de las cepas en estudio. Se utilizó como controles diferentes estímulos conocidos, como los generados por lipopolisacáridos de bacterias Gram (-) (LPS), ácido lipoteicoico de bacterias Gram (+) (LTA) y lisado bacteriano de *E. coli* (EC) y *S. aureus* (SA). Tanto LPS como LTA fueron utilizados como estímulos control en estudios previos, demostrándose que no afectan la viabilidad de las líneas celulares de epitelio mamario a luego de 24 hs de incubación [Strandberg y col., 2005]. Se consideró por lo tanto 24 hs como tiempo máximo de exposición de las células a la infección bacteriana.

Dado que las cepas F indujeron mayor respuesta de citoquinas a las 24 hs pos-infección, los cultivos de células MAC-T se estimularon con las 9 cepas de SCN con F CFB de las 3 cepas de cada especie de SCN, *S. chromogenes*, *S. xylosus* y *S. haemolyticus*. Luego de la infección de las células MAC-T por 24 hs, una cepa de *S. xylosus* desencadenó la mayor liberación de ambas citoquinas IL-6 (Figura 22A) e IL-1 β (Figura 22B), con concentraciones significativamente superiores ($p=0,0001$) a las alcanzadas con los estímulos controles LPS, LTA y los lisados bacterianos, y con respecto al control basal, células sin infección (Figura 19).

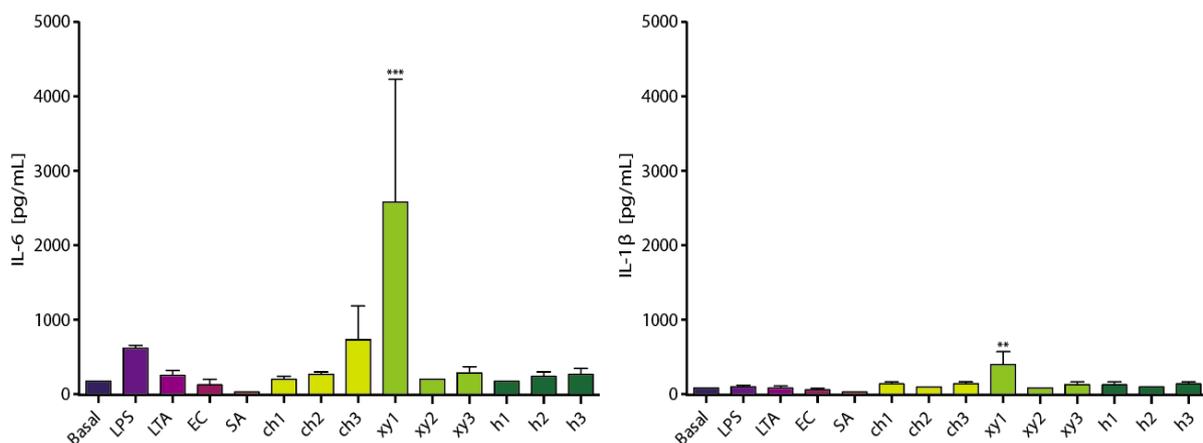


Figura 22. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo celular MAC-T estimulado con diferentes SCN. A- niveles de IL-6 en pg./mL a las 24 hs de infección, B- niveles de IL-1 β en pg./mL a las 24 hs de infección. LPS: lipopolisacáridos, LTA: ácido lipoteicoico, EC: lisado de *E. coli*, SA: lisado de *S. aureus*, S.ch: *S. chromogenes*, S.xy: *S. xylosus*, y S.h: *S. haemolyticus*. (* $p<0.05$).

A los fines del presente trabajo, resulta de importancia la respuesta exacerbada obtenida con la cepa 1 de *S. xylosus*, dado que pertenece a una de las especies de SCN más prevalente y con fuerte capacidad para formar *biofilm*. Es por ello que resulta una

cepa candidata para extraer los antígenos vacunales planteados en el trabajo de tesis.

Los resultados obtenidos reflejan en gran medida lo que sucedería en un modelo *in vivo*, sin embargo, acorde a la bibliografía debería tenerse en cuenta posibles variaciones en el animal de acuerdo a variaciones propias de cada individuo como también aquellas referidas a la etapa de la lactancia en la que se encuentra el animal al momento de la infección [Madsen y col., 2002].

IV.3.2. Evaluación de la respuesta inmune de la cepa elegida en diferentes tiempos y fracciones.

A los fines de lograr una mejor caracterización de la respuesta inmune inducida por la cepa *S. xylosus* 222 en las células MAC-T, se midió la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 β a diferentes tiempos y utilizando como estímulos diferentes fracciones del inóculo de la cepa. Se utilizó para ello sobrenadantes de cultivo planctónico y en biofilm, y precipitados o pellets concentrados de las mismas condiciones de cultivo, como se describió en la sección Materiales y Métodos de este capítulo en el apartado IV.2.8. La elección de los tiempos de estudio, surgieron del análisis de dosis y tiempos de estimulación por LPS y LTA llevados a cabo en trabajos anteriores [Calvinho y Vet, 2001; Strandberg y col., 2005; Wellnitz y Kerr, 2004; Kim y col., 2011] en los cuales evaluaron un modelo similar en el mismo cultivo celular. Se evaluó la respuesta de las células MAC-T inducida frente las diferentes fracciones de los cultivos bacterianos, tanto en modo planctónico como en *biofilm*, obtenidos como se describió en el apartado Materiales y Métodos.

Al realizar un estudio de la cinética de producción de citoquinas por células MAC-T estimuladas con *S. xylosus* 222, se observó una respuesta incrementada de IL-6 a las 24 hs de infección respecto al control LPS, resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Figura 23A). No se observaron diferencias respecto al control Basal, de células sin estímulo, en ninguno de los otros tiempos evaluados. Para el caso de la IL-1 β , se obtuvo una respuesta aumentada, aunque poco marcada y no significativa a las 2 y 24 hs luego de la infección (Figura 23B). Luego de estimular las células MAC-T con las diferentes fracciones de cultivo por 24 hs, se obtuvo el sobrenadante y se evaluó la producción de citoquinas por ELISA. Al evaluar la respuesta de IL-6, se observó para todas las fracciones de cultivo bacteriano una respuesta superior al Basal ($p < 0.05$)

(Figura 23C). Sin embargo, el pellet concentrado de la matriz de *biofilm* estimuló una respuesta superior incluso al control de estimulación LPS ($p < 0.05$). Al evaluar los niveles de IL-1 β no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las fracciones de cultivo estudiadas respecto al Basal (Figura 23D).

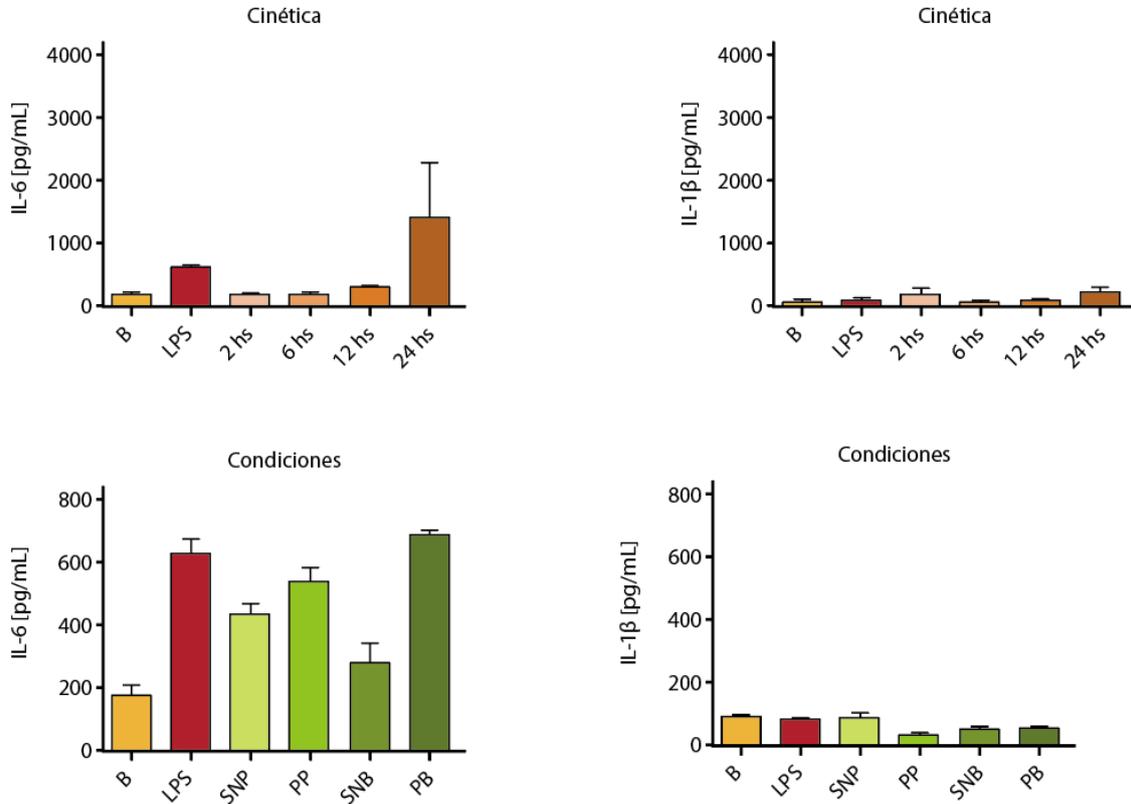


Figura 23. Concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadante de cultivo celular MAC-T. A y B- niveles de IL-6 e IL-1 β en pg./mL a las 2, 8, 12 y 24 hs de infección con *S. xylosous* 222; C y D- niveles de IL-6 e IL-1 β en pg./mL a las 24 hs de estímulo con diferentes fracciones del inoculo *S. xylosous* 222, sobrenadante de cultivo planctónico y en *biofilm* (SNP y SNB), y pellets del cultivo planctónico y en *biofilm* (PP y PB) respectivamente, utilizando como control LPS y basal (B). (* $p < 0.05$).

IV.3.3. Caracterización de la composición de *biofilm*

Previamente, se evaluó la capacidad de formar *biofilm* por las distintas especies de SCN. Considerando que no todas las cepas en estudio presentan la capacidad de estimular una respuesta inmune, nos planteamos caracterizar la composición de la matriz extracelular que compone estos *biofilm*. Se evaluó la composición de las 9 cepas elegidas como F formadoras, 3 representantes de cada una de las 3 especies más prevalentes en la zona. La composición química de los *biofilm* se evaluó midiendo la capacidad de NaIO₄ o proteinasa K para dispersar *biofilm* de SCN, considerando que

estos compuestos degradan polisacáridos y proteínas respectivamente. Después del tratamiento, los *biofilm* se cuantificaron como se describió anteriormente en el capítulo III y se calculó el porcentaje de desprendimiento de los *biofilm* con los distintos tratamientos. Se agruparon estos resultados en 3 categorías como se describió en el apartado Materiales y Métodos de la siguiente manera: (i) Sin Desprendimiento (-10%) (ii) Desprendimiento intermedio (10-49%) y (iii) Desprendimiento Fuerte (+50%).

Tabla 16. Porcentaje de desprendimiento de *biofilm* de las cepas SCN en estudio, frente a tratamientos NaIO₄ y Proteinasa K.

Espece	Cepa	% disrupción NaIO ₄	% disrupción Proteinasa K
<i>S. chromogenes</i>	V65	90,4%	75,0%
	V78	97,5%	62,0%
	68	29,3%	31,8%
<i>S. xylosus</i>	222	43,0%	84,5%
	227	9,4%	49,3%
	228	28,3%	69,9%
<i>S. haemolyticus</i>	22	58,6%	31,1%
	62	23,8%	32,7%
	64	20,2%	40,5%

Los resultados obtenidos fueron variables en cada tratamiento según la especie estudio. En el caso de *S. chromogenes* se vio en 2 de las 3 cepas estudiadas un desprendimiento fuerte con ambos tratamientos, y en una de las cepas ambos tratamientos produjeron un desprendimiento medio (Tabla 16). En base a esta observación, en *S. chromogenes* se podría suponer que ambos compuestos (polisacáridos y proteína) son constitutivos importantes en la matriz de *biofilm* producida y en el mantenimiento de su estructura, ya que se disgrega de forma similar quitando cualquiera de los compuestos. En los *biofilm* de *S. haemolyticus* ocurrió algo similar, aunque con porcentajes menores de desprendimiento. Sin embargo, al evaluar los *biofilm* de las distintas cepas de *S. xylosus* se observa un desprendimiento fuerte en

dos de las cepas estudiadas tratadas con Proteinasa k (Tabla 16). Estos resultados permiten postular que la composición de la matriz de los *biofilm* de estas cepas es en su mayoría de naturaleza proteica. En esta especie, el desprendimiento luego del tratamiento con metaperiodato fue intermedio en 2/3 y nulo en 1/3 de los casos sugiriendo que la estructura de estos *biofilm* es mantenida por compuestos de origen proteico mayoritariamente (Tabla 16).

Sin diferenciar entre especies de SCN pudimos encontrar porcentajes atribuibles a desprendimiento nulo en el 11% (1/9), intermedio en el 56% (5/9) y fuerte en el 33% (3/9) de las cepas estudiadas frente al tratamiento con metaperiodato y para proteinasa K, 45% (4/9) y 55% (5/9) desprendimiento intermedio y fuerte respectivamente (Tabla 16). Estos resultados, permiten asignar una mayor importancia del componente proteico en la estructura de la matriz de *biofilm* en este grupo de especies SCN. Los antecedentes en el tema postulan que el compuesto que estabiliza los *biofilm* es de naturaleza polisacáridica basados en el estudio de una única cepa de la especie *S. epidermidis* (RP62A) ampliamente estudiada como representante de este grupo heterogéneo [Sadovskaya y col., 2005]. En otros estudios con un aislamiento de *S. aureus*, se describe que la matriz de esta cepa permanece intacta luego de exponerla al tratamiento con agentes anti-proteínicos [Ferreira y col., 2014 y Kogan y col., 2006]. Sin embargo, estos resultados basados en una sola cepa en estudio, se contraponen a los obtenidos en el presente trabajo. En concordancia con nuestros resultados, en el trabajo de Olivera y col., (2015) se compara una cepa de referencia con aislamientos clínicos, y se muestra claramente resultados similares a los nuestros con un porcentaje de 30-80% atribuible a compuestos proteicos.

Otros autores muestran mayor porcentaje de compuestos proteicos en la estructura de la matriz de *biofilm* de *Staphylococcus* spp. Onicuc y col. (2016) demuestran una reducción de 60-70% con agentes anti proteínicos y un 20-49% en presencia de agentes anti polisacáridicos sobre las especies *S. lentus*, *S. cohnii* y *S. saprophyticus*. Fredheim y col. (2009) describen 98% de disrupción con proteinasa K y 38% con NaIO₄ en *S. epidermidis* y *S. lugdunensis*. Por otro lado, se describió en 2 aislamientos un porcentaje de disrupción del 75% con metaperiodato (75%) y similar al descrito en la cepa de referencia *S. epidermidis* RP62A [Sadovskaya y col., 2005]. Sin embargo, cabe destacar que esos aislamientos también mostraron un porcentaje de disrupción importante (50%) frente a proteinasa K, por ende, se podría decir que ambos componentes tienen papeles fundamentales en el mantenimiento de la estructura de la matriz. De acuerdo con esto,

en estudios realizados en *S. epidermidis*, *S. aureus* y *S. lugdunensis* se demuestra que los polisacáridos con enlaces β 1-6 (sobre los que tiene acción el metaperiodato) probablemente no sean el componente principal de la matriz de las biopelículas “Independientes de PIA” [Fitzpatrick, 2005; Frank y col., 2007; Qin y col., 2007; Sadovskaya y col., 2005; Toledo-Arana y col., 2005].

Por otro lado, si se comparan ambos tratamientos, aquellas biopelículas que se rompieron más con NaIO_4 se las denominó “Grupo Polisacarídico” y a las que lo hicieron con Proteinasa K se las denominó “Grupo Proteico”, por simplicidad y simulando la descripción realizada por Fagerlund (2016). Jabborini y Sadovskaya (2010) refuerzan este concepto, asegurando que aquellas biopelículas que presentan mayor disrupción frente al tratamiento con Proteinasa K, producen una matriz constituida principalmente por proteínas y no por polisacáridos.

En la comparación realizada en el presente trabajo obtuvimos que un 33% de las cepas pertenecen al grupo polisacarídico (3/9), el 45% al grupo proteico (4/9) y el 22% (2/9) mostraron valores de disrupción bajos y a la vez similares entre ambos tratamientos, por ende, en estos grupos se podría decir que el mantenimiento de la estructura de la matriz esta sostenido por ambos componentes por igual (Figura 24).

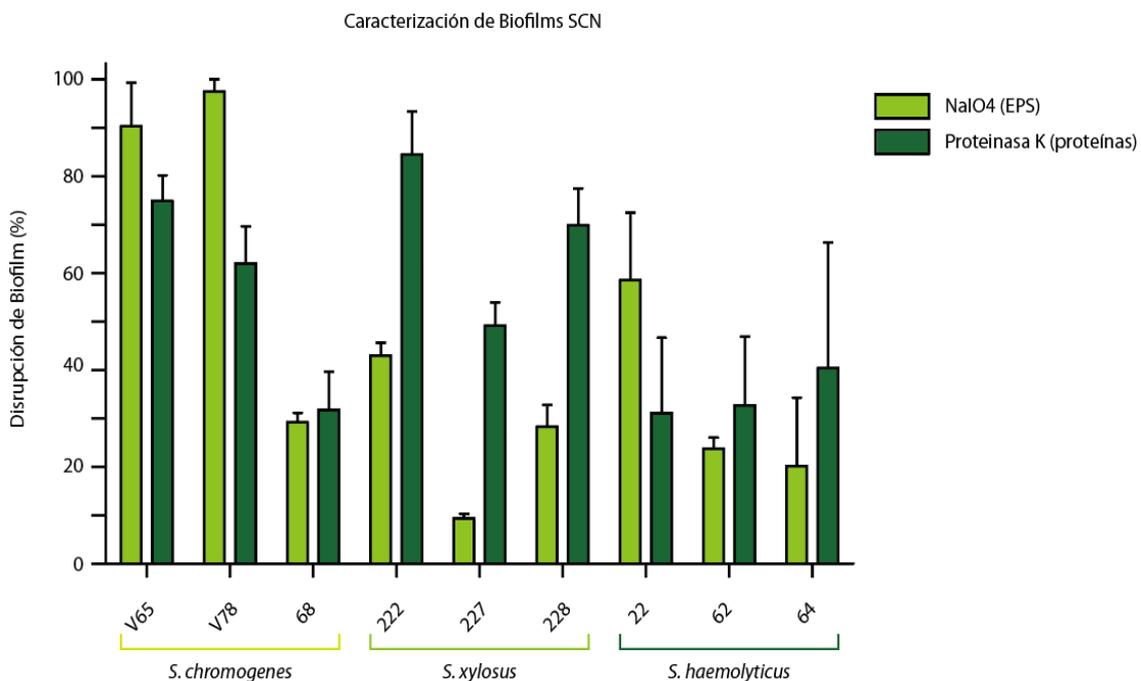


Figura 24. Porcentaje de disrupción de *biofilm* maduros de las cepas de SCN utilizando meta-periodato de sodio (NaIO_4), para degradar los polisacáridos con enlaces β -1,6, y proteinasa K, para degradar las proteínas.

Teniendo en cuenta la diferencia por especie, *S. chromogenes* parece producir *biofilm* mayoritariamente de tipo polisacárido, para *S. haemolyticus* la distribución fue homogénea en ambos grupos, mientras que para *S. xylosus* el 100 % de las cepas (3/3) mostraron un porcentaje de disrupción elevado con agentes anti-proteínicos. A su vez, las cepas de *S. xylosus* mostraron una marcada diferencia con baja disrupción con metaperiodato, asociando estos resultados a un *biofilm* de tipo proteico, siendo la cepa *S. xylosus* 222 la que presentó mayor disrupción (Figura 25).

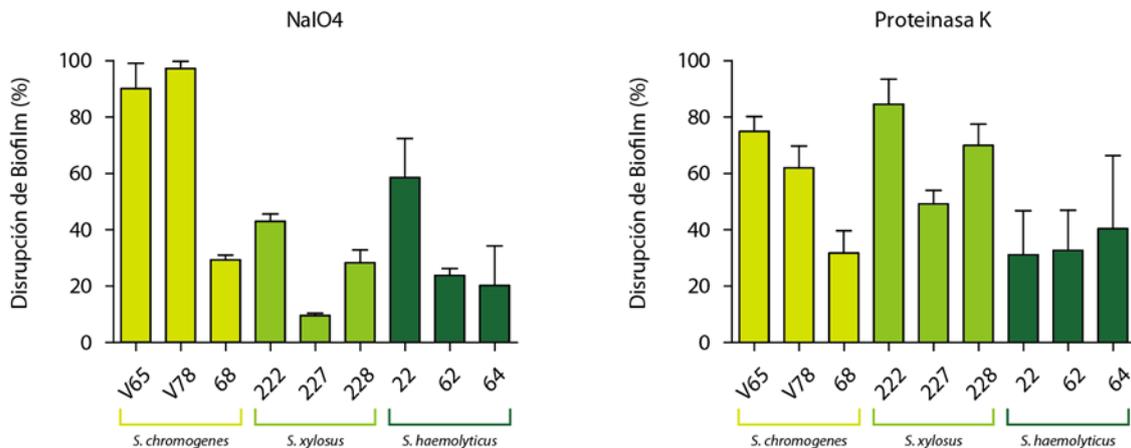


Figura 25. Porcentaje de disrupción de *biofilm* maduros de las cepas de SCN utilizando meta-periodato de sodio (NaIO₄) para degradar los polisacáridos con enlaces β-1,6 (a) y la proteínasa K para degradar las proteínas (b) por especie. *S. chromogenes* (barras verde limas), *S. xylosus* (barras verdes) y *S. haemolyticus* (barras verde oscuras).

La composición de los *biofilm* debe conocerse para proporcionar una base para el desarrollo de mejores estrategias para prevenir y tratar enfermedades clínicas asociadas a este tipo de infecciones. El mecanismo más común de formación de *biofilm* en las especies depende de la producción de PIA como el componente más importante de la matriz de *biofilm* [Arciola y col., 2015]. También se cree que el ADN y los ácidos teicoicos asociados a la pared celular tienen funciones estructurales en las biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis*, mientras que las interacciones electrostáticas e hidrófobas inespecíficas mediadas por ácidos teicoicos, ADN y proteínas de superficie hidrófobas pueden contribuir a la adhesión primaria a superficies abióticas [Izano y col., 2008; Jabbouri y Sadovskaya, 2010; Becker y col., 2014; Büttner y col., 2015]. Curiosamente, no solo la biopelícula en sí misma, sino que la composición de la matriz parece afectar la resistencia bacteriana. Se ha demostrado que la sensibilidad de los *biofilm* a las enzimas se puede utilizar indirectamente como un método para encontrar la naturaleza de la matriz de los *biofilm* [Chaignon y col., 2007; Fredheim y col., 2009]. Bajo la

premisa de que en una infección causada por bacterias creciendo en *biofilm*, la interfaz entre el huésped y la bacteria es la matriz extracelular, varios autores han buscado analizar el potencial de estos componentes para inducir una respuesta inmune protectora contra infecciones estafilocócicas, estudiando las variaciones en la composición de los *biofilm* polisacáridicos o proteicos. El componente proteico se estudió mediante técnicas de proteómicas, caracterizando las proteínas de ambos tipos de *biofilm*. Se logró concluir que existe un núcleo común de proteínas secretadas en la matriz de ambos tipos de *biofilm* y por ende sería óptimo buscar una cepa con mayor contenido proteico. Esto debido a que la inmunización con un extracto de proteínas de la matriz de *biofilm* fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral y la producción de diferentes interleuquinas en estudios utilizando un modelo murino demostrando el potencial de las exoproteínas de la matriz de *biofilm* como antígenos vacunales multivalentes frente a infecciones causadas por *biofilm* estafilocócicos [Burgui, 2018]. En base a estos antecedentes y de acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa de *S. xylosus* 222 que presentaría mayor porcentaje de proteína en su matriz resulta una cepa candidata de elección para la obtención de antígenos vacunales a los fines de este trabajo.

IV.3.4. Ensayo *in vivo*

Luego de un minucioso estudio de las cepas para buscar a la candidata ideal para obtener el inmunógeno a aplicar, en base a los resultados obtenidos en este trabajo se dirigió la atención a la especie *S. xylosus*. Esta especie es la segunda más prevalente en la zona de estudio y la que muestra una mayor capacidad de formación de *biofilm*. A su vez, en los ensayos de infección *in vitro* en cultivos celulares, previos a esta instancia *in vivo*, esta especie demostró mayor capacidad de supervivencia intracelular, como así también mayor inducción de respuesta inmune de tipo II-6 en las células luego de 24 hs de infección. En un estudio más detallado observamos que una cepa de esta especie en particular, la nombrada *S. xylosus* 222, fue capaz de inducir una respuesta marcadamente incrementada, mostrando una fuerte capacidad formadora de *biofilm* y resultó de composición mayoritariamente proteica. Es por ello que esta cepa, bajo todos los parámetros en observación, resultó la candidata de elección.

IV.3.4.1. Prueba de reacción al producto

Se evaluó en un grupo reducido de animales y previo a la inmunización, la reacción de las formulaciones desarrolladas. Para ello, se inocularon 3 animales con las formulaciones Q, AL y V de los 3 grupos distintos al grupo C. Se evaluó clínicamente el estado general de salud de los animales en estudio y lesiones en la zona de aplicación, mediante la observación durante 7 días. No se observaron durante el período de estudio, signos de inflamación importante, solo una inflamación localizada leve en el animal al que se le aplicó el inmunógeno de formulación AL. Ninguno de los animales presentó dolor a la palpación, malestar, pérdida de apetito, fiebre o ningún otro síntoma generalizado.

IV.3.4.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral

Luego de comprobar que no existiera ninguna reacción que comprometiera la salud de los animales en estudio, se procedió a inmunizar los animales seleccionados para el estudio. Se aplicó el esquema de inmunización y muestreo descrito anteriormente en el apartado Materiales y Métodos. Se recolectaron muestras de sangre de cada animal cada 7 días, a los días -56, -42, -35, -28, -21 y -14 previo al parto y a los días 14, 21, 28 y 56 posteriores al parto, resultando en 10 muestras de sangre por cada animal. Además, se tomaron muestras de calostro y 4 muestras de leche a cada animal, a los días 14, 21, 28 y 56 posteriores al parto. Se descartó un animal perteneciente al grupo C, por haber presentado un aborto espontáneo, pudiendo esto interferir con sus condiciones fisiológicas normales y con los parámetros a medir en este estudio. Las vaquillonas parieron en un período promedio de 15 días de la fecha estimada de parto, y ninguna presentó IIM durante el período en estudio.

IV.3.4.2.1. Determinación de anticuerpos específicos en suero de los animales inmunizados

Se evaluó la respuesta de anticuerpos específicos mediante la técnica de ELISA a fin de determinar el efecto de las inmunizaciones en la respuesta inmune humoral. Se tuvo en

cuenta como unidad experimental cada animal y los datos de $DO_{450\text{ nm}}$ obtenidos en cada tiempo de muestreo se expresaron como diferencia con respecto al valor inicial (Tiempo -56), inherente a la exposición natural en el ambiente. Se estudiaron las respuestas de anticuerpos de tipo IgG, IgG1 e IgG2 en suero (Figuras 26, 27 y 28, respectivamente), en todas las muestras recolectadas.

Al medir la respuesta humoral, se pudo evidenciar un comportamiento similar en todos los isotipos estudiados teniendo en cuenta los grupos inoculados (AL y V) en donde la concentración fue superior a los 14 días de la primera inoculación (Día -42) y a los 7 días de la segunda (Día -21). Luego los niveles descendieron poco antes de la fecha de parto. Entre la tercera y cuarta semana pos parto se observó un incremento coincidiendo con la aplicación de la tercera dosis, y descendiendo el nivel de Ig cerca del día 60 pos parto, aunque aún resultaron significativamente incrementados respecto de los grupos control, salvo para IgG1. Estos resultados fueron similares a los descritos en estudios con otros inmunógenos [Sjölander y col., 1997] y los niveles resultaron superiores en el tiempo a los obtenidos en otros trabajos donde el aumento de respuesta solo se evidenciaba hasta el día 14 pos parto en casos de formulaciones que utilizan el adyuvante a base de Aluminio [Lee y col., 2005; Camussone y col., 2013].

Al evaluar los niveles de IgG en ambos grupos que recibieron el inmunógeno (AL y V), o grupos vacunados, se pudo observar que las muestras de estos animales presentaron niveles de IgG significativamente superiores a los presentes en los grupos control (C y Q), cuyas diferencias significativas se indican en el gráfico de la figura 26 con letras distintas ($p < 0.05$). Para AL y V, la mayor concentración de IgG se obtuvo los 15 días de la primera inoculación (-42) y a los 7 días de la segunda (-21) ($p < 0.05$). En general, la respuesta fue superior en el grupo al cual se le inoculó el inmunógeno acompañado del adyuvante Q (V) y a diferencia del grupo de adyuvante AL, que en los días -28, 14 y 21 no presentó diferencias significativas con los controles C y Q. Cabe destacar que la respuesta fue sostenida en el tiempo, siendo V el único grupo diferenciado con mayores niveles al final del muestreo.

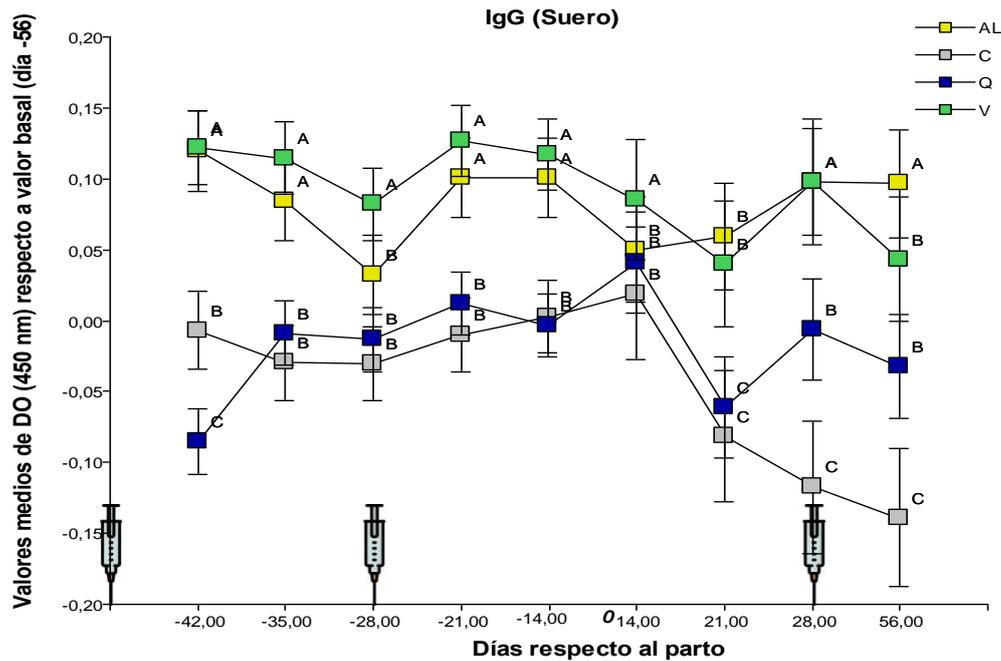


Figura 26: Niveles de IgG específicos en suero. Diferencia de medias de DO_{450nm} respecto de valor basal en día -56 (56 días antes del parto) según días respecto al parto y tratamientos. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la respuesta de IgG1, se obtuvo un valor medio significativamente mayor en el grupo V en el día 28 pos parto (Figura 27). Cabe destacar que ninguno de los grupos restantes presentó un incremento de respuesta significativo en los demás tiempos, aunque se observa una tendencia leve de aumento de respuesta luego de cada inoculación.

Al evaluar los niveles séricos de IgG2 específica, tanto los grupos V y AL presentaron valores mayores que los grupos controles Q y C, con una respuesta más sostenida en el tiempo (Figura 28). El grupo V mostró valores aún superiores al grupo AL, con diferencias significativas en todos los tiempos estudiados, diferenciándose además de los controles Q y C. Esto se representa en el gráfico de la figura 28 con letras distintas, indicando diferencias significativas ($p < 0,05$).

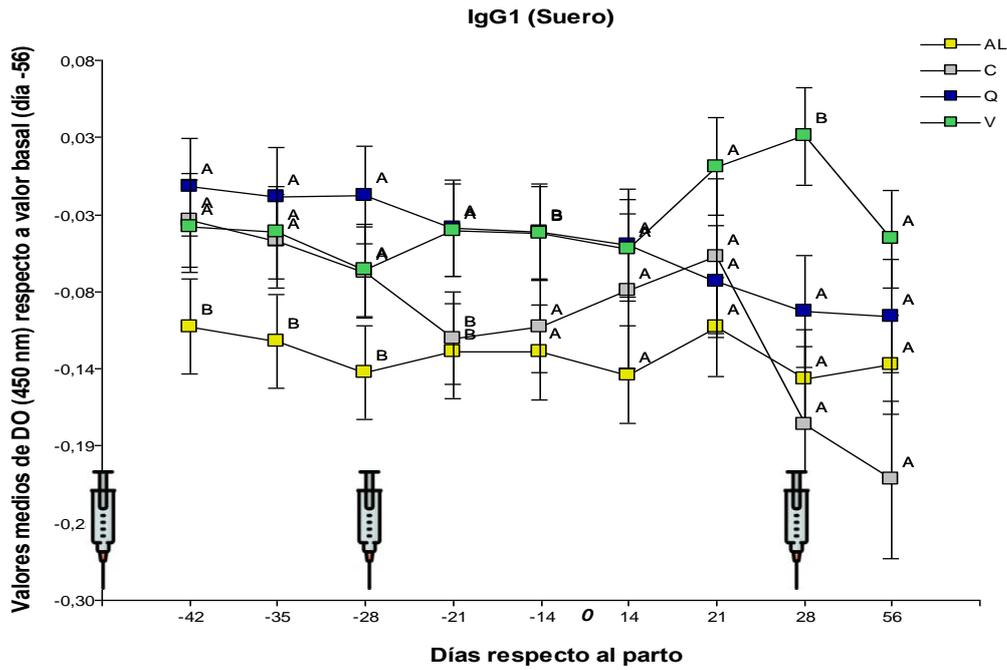


Figura 27: Niveles de IgG1 en suero. Diferencia de medias de DO_{450nm} respecto de valor basal en día -56 (56 días antes del parto) según días respecto al parto y tratamientos. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante Q, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

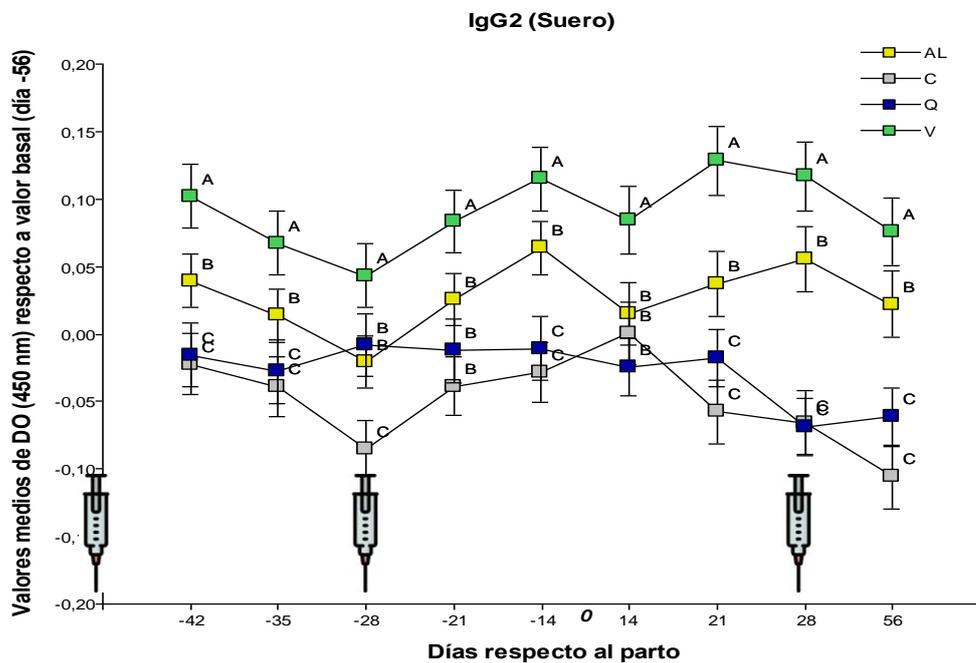


Figura 28. Niveles de IgG2 en suero. Diferencia de medias de DO_{450nm} respecto de valor basal en día -56 (56 días antes del parto) según días respecto al parto y tratamientos. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el presente estudio, sobre la base de los registros del rebaño, no se registraron casos de mastitis en los de cultivos bacteriológicos de las muestras de leche. Según nuestro conocimiento, los animales incluidos en este ensayo controlado eran todas vaquillonas de primer parto, por ende, nunca habían estado en lactancia. Como se esperaba, todas las vaquillonas presentaron niveles de anticuerpos estadísticamente similares previo a la inoculación. En el momento del muestreo posterior a la aplicación de la vacuna en estudio, había una presencia sérica de Igs media sustancialmente mayor en los grupos vacunados versus grupos controles, y esto continuó hasta el parto con una disminución de la respuesta media previo a la segunda dosis. Se encontró una disminución notable en suero en el momento previo al parto, estos hallazgos son consistentes con otros estudios en los cuales también se encontró esta baja de Ig sérica previa al parto [Kehrli y col., 1989; Ishikawa y col., 1987]. Estos cambios del estado inmune en las vacas lecheras y en la cantidad de Ig disponibles en sangre comienzan aproximadamente 3 semanas antes del parto y continúan hasta 3 semanas después del parto [Mallard y col., 1998].

IV.3.4.2.2. Determinación de anticuerpos específicos en calostro de los animales inmunizados

Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos en el calostro de los animales en estudio, el cual se obtuvo antes de las 24 hs pos parto. Se observó para todas las Igs estudiadas, diferencias significativas en los valores medios de DO_{450nm} siendo superiores los valores correspondientes a AL y V sin diferenciarse entre ellos y ambos con valores medios más altos que los tratamientos C y Q (Figuras 29, 30 y 31).

El análisis de los niveles de anticuerpos específicos en calostro resulto de suma importancia ya que evidencia el paso de Ig desde suero, al sitio de interés que es la GM, donde se espera que tengan capacidad neutralizante frente a infecciones por *Staphylococcus* coagulasa negativos [Boerhout y col., 2018]. Debido a que la transferencia intrauterina de inmunoglobulinas maternas a través de la placenta al feto no ocurre en bovinos, los terneros nacen con niveles extremadamente bajos de Ig en suero y la absorción de anticuerpos del calostro después del nacimiento es esencial para proporcionar inmunidad pasiva durante el período neonatal. Las concentraciones séricas de Ig después de la ingestión de calostro se asocian con una disminución de la morbilidad y la mortalidad de la mayoría de las enfermedades infecciosas de los

neonatos, incluidas la septicemia, la diarrea, las enfermedades respiratorias y la onfaloflebitis [Besser y col., 1988; Gay y col., 1984]. Todas las principales clases de Ig están presentes en el calostro materno, y todas son capaces de ser absorbidas por el intestino del recién nacido, sin embargo, IgG1 es la Ig predominante en el calostro y posteriormente en el suero de un ternero alimentado con calostro. Aunque con frecuencia se señala la importancia de IgG1 (como en este caso) como un marcador de la efectividad final del proceso de transferencia pasiva, el enfoque de IgG1 no debe tomarse para indicar que otras clases de Ig no son significativas [Logan y col., 1972]. En base a estos resultados y como perspectiva futura, cobra relevancia determinar la concentración efectiva de Ig en calostro, con capacidad protectora en los terneros, lo cual escapa al alcance del presente trabajo de tesis. Para ello sería necesario desafiar a los terneros que consuman dicho calostro, con el agente infeccioso a fin de determinar si se proporciona alguna protección a través de calostro de madres vacunadas.

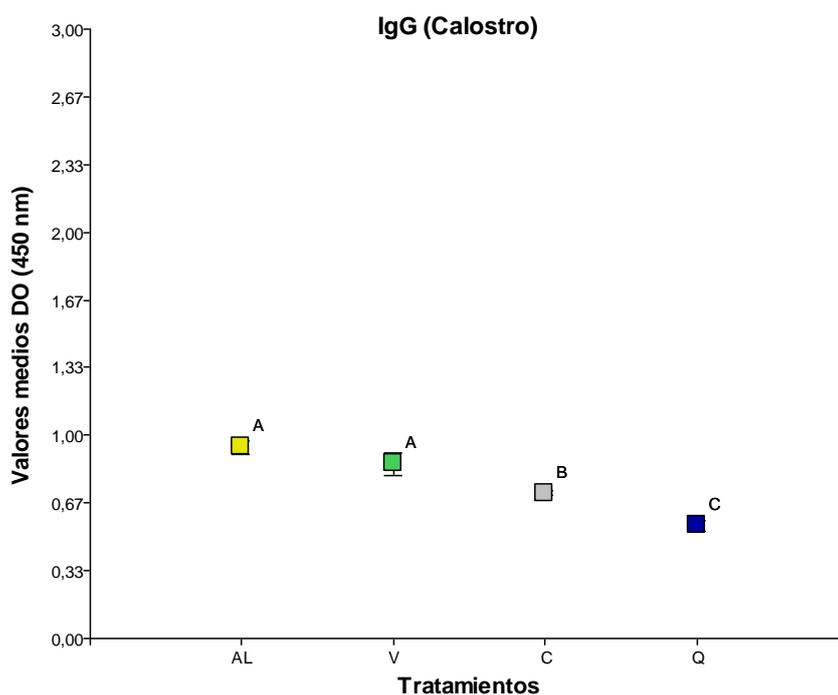


Figura 29. Niveles de IgG en calostro. Media de DO_{450nm} según tratamiento. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

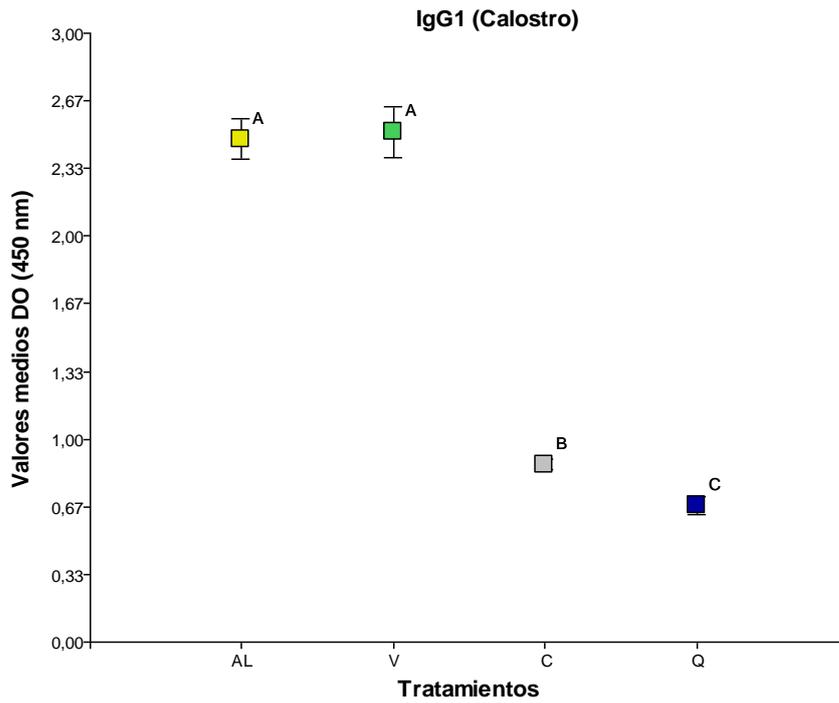


Figura 30. Niveles de IgG1 en calostro. Media de DO_{450nm} según tratamiento. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

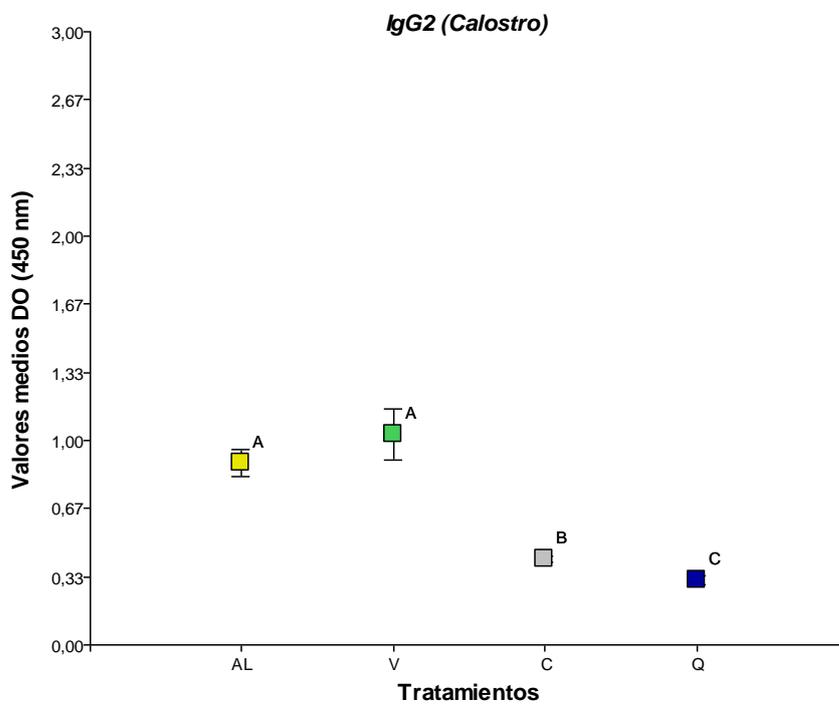


Figura 31. Niveles de IgG2 en calostro. Medias de DO_{450nm} según tratamiento. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el suero sanguíneo, las concentraciones de IgG1 generalmente disminuyen en el momento del parto [Kehrli y col., 1989; Detilleux y col., 1995]. La colostrogénesis comienza aproximadamente 15 días antes del parto. Este evento está marcado por un activo y selectivo transporte de Ig, generalmente de subclase IgG1, a la GM [Watson y col., 1980; Concha y col., 1986]. La calidad del calostro puede verse influenciada por la vacunación, con mayor producción de anticuerpos protectores y transporte de anticuerpos hacia la GM. En el presente estudio, las vacas vacunadas produjeron calostro con mayores niveles de IgG1 específica, en comparación con los animales no vacunados. En este estudio, la finalidad principal fue determinar el traspaso efectivo de anticuerpos a la GM, sitio donde ocurren las infecciones.

IV.3.4.2.3. Determinación de anticuerpos específicos en leche de los animales inmunizados

Por último, se evaluó la respuesta de anticuerpos en leche obtenida luego de la inmunización. Para todos los isotipos en estudio, se observó en términos generales un comportamiento similar, obteniéndose una respuesta superior en los grupos vacunados AL y V significativamente diferente a los grupos control C y Q en los días 14, 21 y 28 pos parto (Figura 32, 33 y 34). En todos los casos la respuesta disminuye progresivamente al transcurrir el tiempo, no diferenciándose de los controles en el tiempo 56 pos parto.

Al evaluar la respuesta de IgG específica en leche, se observa la distinción entre los tratamientos vacunados AL y V en los días 21 y 28 posparto, con valores significativamente mayores en el grupo V (Figura 32). Los niveles de IgG1 e IgG2 específicos presentan el mismo comportamiento, resultando significativamente mayor en AL y V con respecto a los grupos controles C y Q, sin embargo, no se observa diferencia entre ambos grupos inmunizados (Figura 33 y 34). Esto se representa en el gráfico de las figuras 32, 33 y 34 con letras distintas, indicando diferencias significativas ($p < 0.05$).

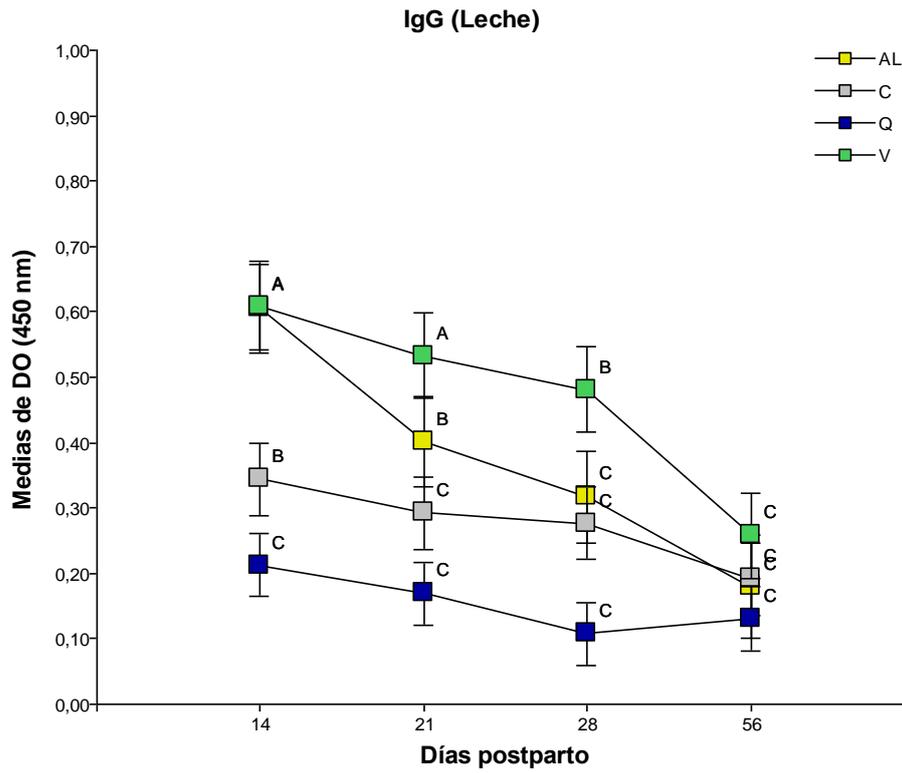


Figura 32. Niveles de IgG en leche. Media de DO_{450nm} según tratamiento. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

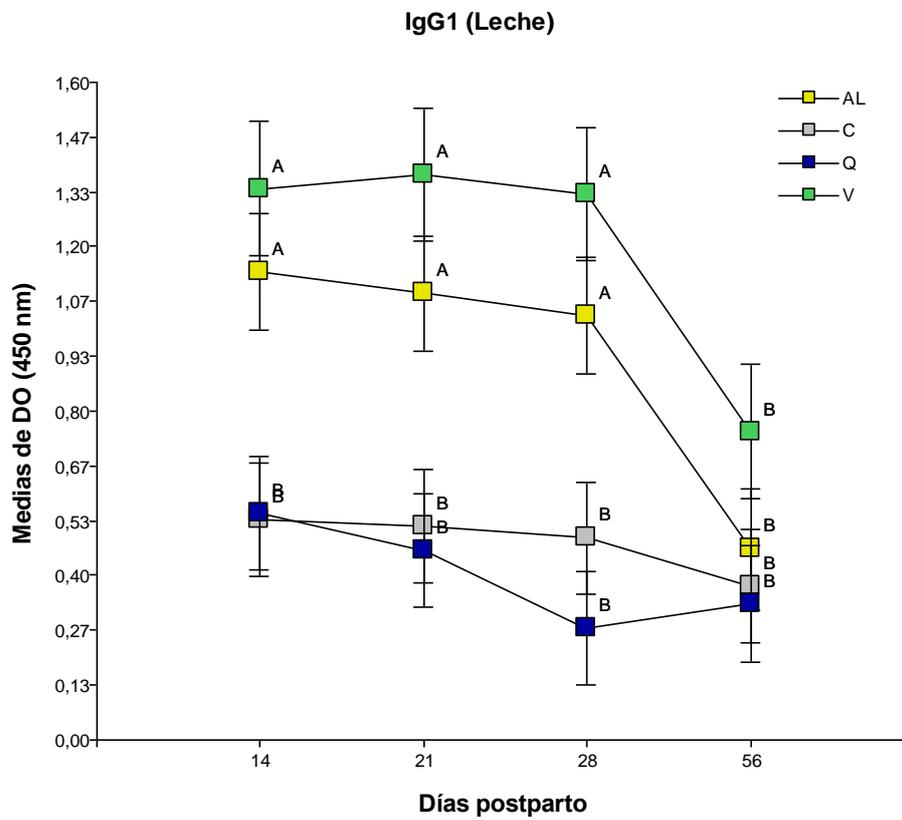


Figura 33. Niveles de IgG1 en leche. Media de DO_{450nm} según tratamiento. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

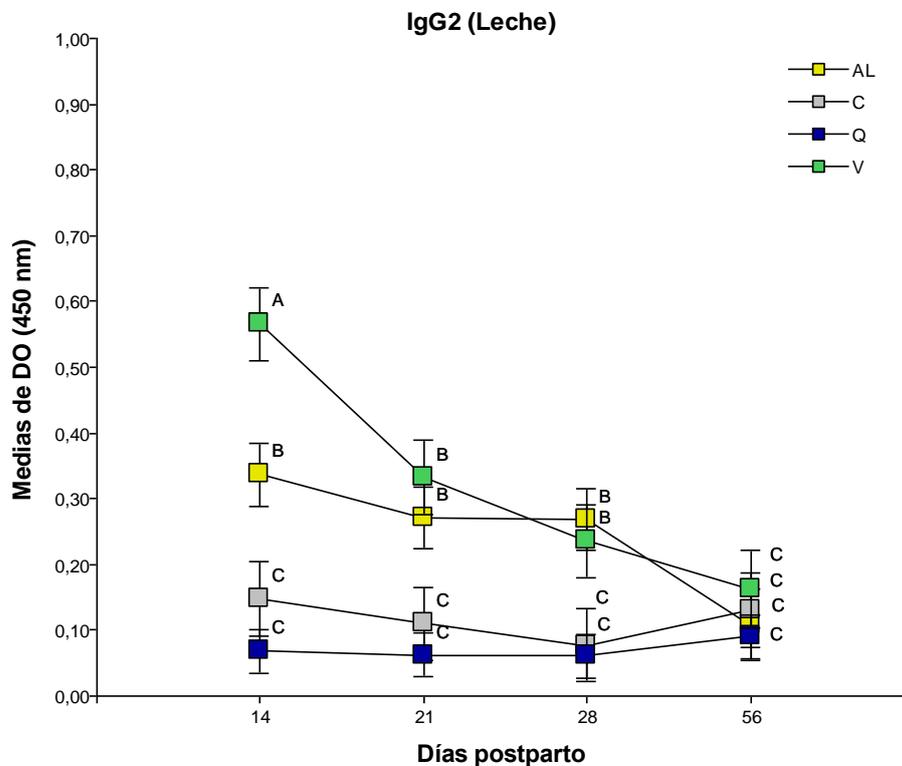


Figura 34. Niveles de IgG en leche. Media de DO_{450nm} según tratamiento. AL: inmunógeno + adyuvante hidróxido de aluminio, C: control no inmunizado, Q: control adyuvante, V: inmunógeno + adyuvante Q. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El análisis de la leche, mostró significativas diferencias entre los 2 grupos vacunados, respecto a ambos controles. Sin embargo, los niveles de IgG1 de la leche resultaron menores que los niveles de IgG1 en calostro. Estos resultados presentan similitudes consistentes con reportes previos, dado que se esperan mayores concentraciones de IgG1 en el calostro que en la leche, [Calloway y col., 2008]. Será necesario investigación adicional como por ejemplo evaluar la eficacia en infecciones experimentales de los terneros que hayan consumido calostro de vacas vacunadas como ya fue descrito, y la evaluación de los niveles de anticuerpos de las vacas en estudio antes del próximo período de lactancia. Estos resultados permitirán validar su uso práctico como inmunógeno adecuado, al determinar si las Ig anti-biofilm de SCN obtenidas presentan capacidad protectora, si pasan activamente a los terneros y si en periodos siguientes están presentes aún en el rebaño.

La relación entre aumento de concentración de Ig y la reducción de conteos bacterianos se ha comprobado en la literatura en modelos de inmunización con bacterinas concentradas de *S. aureus* crecido en *biofilm*, debido a que los anticuerpos específicos generados presentaron la capacidad de opsonizar antígenos específicos en las bacterias, favoreciendo la fagocitosis [Prenafeta y col., 2010], lo cual también se demostró en otros trabajos con PNAG [Kelly-Quintos y col., 2005; Maira-Litrán y col., 2005].

Las vaquillonas en este estudio recibieron 2 dosis antes del parto, de modo de alcanzar niveles de anticuerpos elevados durante el primer mes post parto, debido a que es el periodo de mayor susceptibilidad a IIM [Sordillo y Streicher, 2002; Burton y Erskine, 2003]. Se inoculó una tercera aplicación para tratar de extender la respuesta protectora al menos hasta el máximo tiempo estudiado en situaciones similares [Sjölander y col., 1997], ya que, en la mayoría de los trabajos encontrados en la bibliografía, se sabe que la respuesta no llega a ser sostenida más allá del día 14 pos parto [Lee y col., 2005].

Con el fin de mejorar la salud general, el bienestar y la productividad de las vacas lecheras, específicamente contra mastitis, se han practicado durante años estrategias de prevención [Barkema y col.0, 2006; Keefe, 2012]. El desarrollo de vacunas dirigidas a los principales patógenos de la ubre ha avanzado en las últimas décadas. Una revisión de la literatura de los últimos años, demuestra que hay varios prototipos de vacunas experimentales con lisados celulares y vacunas autógenas (específicas de rebaño), sin embargo, unas pocas llegaron a convertirse en vacunas comerciales [Ismail, 2017]. La mayoría de los estudios de eficacia de estas vacunas arrojaron resultados controvertidos, y ninguna hasta ahora se mostró totalmente eficaz. Los patógenos a los cuales están dirigidas fueron en la mayoría de los casos *S. aureus*, *S. agalactiae* y *E. coli*. Las vacunas contra *S. aureus* y *S. agalactiae* contenían el microorganismo completo (lisados celulares, inactivos y vacunas atenuadas) o subunidades (toxinas, proteínas de superficie y polisacáridos) mientras que para *E. coli*, el antígeno mutante J5 se usó con mayor frecuencia. Las vacunas también se clasificaron como mono o polivalentes según el número de patógenos específicos. Dentro de las vacunas disponibles comercialmente, Startvac (Hipra, España) que contiene el antígeno *E. coli* J5 y un lisado de *S. aureus* cepa SP 140 fue una de las más difundidas y fue evaluada en tambos comerciales del Reino Unido en comparación con la autovacuna específica de rebaño BestVac, la cual mostró ser menos eficiente que la primera [Freick y col., 2016]. La misma vacuna se evaluó más adelante en 2 grandes establecimientos lecheros suecos [Landin y col., 2015] con resultados similares. Además, se estudió su eficacia en el grupo de especies

SCN, arrojando resultados positivos en cuanto a la reducción de la duración de la mastitis y en un posterior ensayo de desafío experimental [Schukken y col., 2014].

Otra opción comercial es la vacuna J5, dirigida a *E. coli* para la cual se evaluó su eficacia en la reducción de la duración de la mastitis y los niveles de anticuerpos relacionados a la resolución de esta patología, IgG1 e IgG2, los cuales fueron significativamente mayores que en las vacas controles [Wilson y col., 2009]. Otra opción menos difundida comercialmente pero que también llegó a mercado fue MastaVac, la cual utiliza como antígeno una enterotoxina estafilocócica tipo C producida por una cepa mutante, su eficacia fue evaluada en estudios de mastitis inducidas experimentalmente con una cepa de la especie *S. aureus* cepa 409 [Chang y col., 2008]. A pesar de todas las opciones de vacunas disponibles, la mastitis sigue siendo una de las principales enfermedades que afectan económicamente la producción láctea. Es por ello que estas estrategias preventivas necesitan mayor estudio, así como también complementarlas con otros procedimientos de control como una correcta rutina de ordeño, correctos tratamientos de casos clínicos, segregación y descarte de animales crónicos para así reducir de manera significativa la incidencia duración de las IIM.

IV.3.4.2. Análisis bacteriológico y Recuento de Células Somáticas

Se midió mediante una marcha bacteriológica convencional la presencia de infecciones bacterianas por *Staphylococcus* spp. en todas las muestras de leche estudiadas. Los resultados se expresaron como positivo (1) y negativo (0). Se realizó un análisis comparativo para relacionar las frecuencias relativas de infecciones por este grupo bacteriano según los grupos en estudio, mediante un estudio de prueba de independencia. En cuanto al análisis de la tabla de frecuencias (Tabla 17) se observó para todos los grupos el predominio de muestras con resultados negativos respecto de la infección. Los resultados observados en las muestras indican (mediante prueba de independencia) que no hay evidencias para garantizar la asociación entre los tratamientos evaluados y la presencia de infección por SCN durante el periodo de estudio. De todas formas, la muestra de animales es pequeña y se deberían llevar a cabo más estudios.

Tabla 17: Frecuencias absolutas de infección por *Staphylococcus* spp. y grupo de tratamiento. Prueba de independencia por chi-cuadrado de Pearson ($p < 0.05$ indica asociación entre las variables). El número total de muestras es variable por cuestiones inherentes a los animales (diferente cantidad de cuartos mamarios o presencia de algunos anatómicamente inhabilitados).

GRUPO	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
AL	1	33	34
C	1	31	35
Q	1	34	35
V	1	25	26
TOTAL	4	123	127

En cuanto a RCS se realizaron ajustes de modelos lineales generales y mixtos, para determinar su asociación con IIM y reacciones inflamatorias entre los grupos evaluados. El resultado obtenido indicó que no hay evidencias para determinar diferencias significativas en los valores de RCS respecto de los tratamientos evaluados y de sus interacciones con los tiempos de evaluación (Véase Tabla resultado del modelo general lineal y mixto para RCS en el apartado Anexo), lo cual es positivo ya que no se demostró una respuesta inflamatoria ni alteraciones en la ubre en los animales inoculados, protegiendo así su bienestar.

En trabajos en los cuales se desarrollaron vacunas, se realizaron modelos de infección experimental, induciendo infecciones controladas para probar la efectividad y la capacidad neutralizante y aglutinante de las Ig obtenidas [Camussone y col., 2013; Prenafeta y col., 2010]. Lo ideal sería a nuestro criterio realizar ensayos a campo de pruebas de eficacia con infecciones naturales y tasas de curación espontánea para medir la capacidad neutralizante de estos anticuerpos producidos, ya que los modelos de desafío experimental, a nuestro entender, no reflejan los mecanismos naturales de infección.

En conclusión, este estudio reporta la capacidad de inducir una respuesta humoral del inmunógeno propuesto a base de cultivos bacterianos crecidos en *biofilm* de la cepa *S. xylosus* 222. Los resultados obtenidos permiten postular a la cepa y al inmunógeno

obtenido, enriquecido en la matriz del *biofilm*, como un posible antígeno para desarrollar vacunas comerciales para prevenir infecciones por SCN formadores de *biofilm*. Esta estrategia presenta una buena relación costo/beneficio a ser utilizada en la prevención de la MB ya que el modo de obtención y el esquema de preparación utilizado haría posible obtener cantidades escalables de inmunógeno a bajo costo y de manera rápida. Este estudio se apoya en otros trabajos en los cuales obtuvieron antígenos de características similares con concentrados de *biofilm* en ovinos con una buena protección y bajo costo de producción [Pérez y col., 2009].

Se destaca la respuesta incrementada obtenida del anticuerpo IgG2 en todas las muestras y en ambos grupos vacunados con el antígeno V y AL, dado que esta subclase es considerada la opsonina más importante involucrada en la fagocitosis por neutrófilos en la GM infectada [Sordillo y Streicher, 2002, Paape y col., 2003]. A pesar de que la IgG1 es la subclase predominante en leche normal debido a la transferencia selectiva de la sangre a leche, su concentración disminuye durante la inflamación y el rol exacto de la misma en la defensa inmune frente a IIM está poco definido [Burton y Erskine, 2003]. Se describió que los niveles de IgG2 aumentan considerablemente durante la inflamación, actuando como opsonina para incrementar la actividad fagocítica de los polimorfo nucleares en bovinos, con un rol trascendental en la eliminación de patógenos de la GM [Paape y col., 2003; Sordillo y Streicher, 2002]. Los niveles obtenidos fueron en general superiores en la formulación con adyuvante Q en comparación con la formulación que llevaba el adyuvante comercial a base de Hidróxido de Aluminio. Los adyuvantes son compuestos inmunoestimuladores que se incluyen en las formulaciones de vacunas de subunidades para ayudar a dirigir y amplificar las respuestas inmunes adaptativas. Q es un polisacárido catiónico que se ha estudiado como adyuvante debido a su naturaleza biocompatible y biodegradable. Se ha demostrado que este polisacárido tiene la capacidad de inducir respuestas de células Th1 después de la vacunación por inyección o por rutas mucosas, lo que respalda su aplicación como una alternativa al Hidróxido de Aluminio [Moran y col., 2018]. De acuerdo a los resultados obtenidos, este biopolímero presentaría mayor capacidad de estimular una respuesta inmune efectiva en la GM de vacas inmunizadas cuando se lo utiliza como adyuvante. Estos hallazgos describen por primera vez el uso de Q como adyuvante en vacunas para la prevención de la MB, y sientan las bases para un mayor desarrollo de adyuvantes de polisacáridos para uso veterinario.

IV.4. CONCLUSIONES PARCIALES

- El estudio de citoquinas pro-inflamatorias demostró que las cepas de SCN caracterizadas como fuerte formadoras de *biofilm*, inducen una mayor respuesta de IL-6 a las 24 hs de infección *in vitro*.
- La cepa *S. xylosus* 222 indujo una respuesta inmune incrementada respecto al resto de las cepas en estudio.
- El análisis de la matriz de *biofilm* por especie reveló para *S. chromogenes* una composición mayoritariamente de tipo polisacáridica, para *S. haemolyticus* la distribución fue homogénea entre polisacáridos y proteínas, mientras que *S. xylosus* mostró un *biofilm* de tipo proteico.
- Se obtuvo un inmunógeno, a partir del precipitado concentrado de la matriz de *biofilm* de la cepa *S. xylosus* 222, con una mayor capacidad de inducir una respuesta *in vitro*.
- La inmunización con este antígeno y Q estimuló una respuesta de anticuerpos séricos contra los componentes del *biofilm* de SCN.
- Estas estructuras y componentes bacterianos cumplen un rol determinante, tanto en las primeras etapas de la interacción huésped-patógeno como en la permanencia y en la evasión del sistema inmune, y en etapas más avanzadas de la infección.

CONCLUSIONES FINALES

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se caracterizaron aislamientos de SCN de Mastitis Bovina, buscando nuevos antígenos vacunales y estudiando la respuesta inmune inducida en bovinos.

Se realizaron análisis genómicos, y dada la total concordancia de PCR-RFLP de los productos de amplificación relacionados al gen *gap* con MALDI-TOF MS sumado a los resultados que surgen de comparar la identificación a nivel de especie de los aislamientos de SCN por PCR-RFLP del amplicón *gap* con la obtenida por PCR-RFLP del amplicón *groEL* y *Staph-Zym*TM, se concluyó que el análisis de PCR-RFLP de los productos de amplificación asociados a *gap* podría ser un método alternativo útil y confiable para la identificación a nivel de especie de SCN aislados a partir de IIM bovina. Esta identificación resulta esencial para un tratamiento rápido y eficaz considerando que los SCN constituyen un grupo bacteriano predominante en las granjas lecheras de nuestra región.

En lo referente a la capacidad de formación de *biofilm*, detectamos que existe diferencia en las distintas especies de SCN, siendo una característica relevante considerando que esta forma de crecimiento protege a la bacteria de las altas concentraciones de antibióticos y de la fagocitosis. Estudios futuros deberían llevarse a cabo para examinar la asociación de la formación de *biofilm* con el fracaso de los tratamientos y la aparición de IIM persistentes por las distintas especies de SCN en bovinos.

Los estudios llevados a cabo permitieron detectar la presencia de productos de amplificación que podrían corresponder a genes relacionados a los distintos factores de virulencia estudiados, producción de *biofilm*, adherencia, producción de enterotoxinas, resistencia a antibióticos β lactámicos, lo que permitió caracterizar aún más las cepas en estudio. No se encontró una asociación entre la habilidad de formar *biofilm in vitro* por las cepas en estudio y la presencia de un amplicón o combinación de estos, relacionados a adherencia y formación de *biofilm*. Se sugiere una tendencia de asociación entre la presencia de los amplicones *altE* y *embP* con las cepas con fuerte capacidad de formar *biofilm*. Con lo cual es muy poco probable que la formación de *biofilm* en las diferentes especies del SCN ocurra debido a la presencia de un único determinante genético y/o proceso.

Respecto a los productos de amplificación asociados a genes de enterotoxinas

estafilococales, en este trabajo de tesis se puso de manifiesto que estos se encuentran presentes en un importante porcentaje de cepas de SCN, esto, sumado al crecimiento en *biofilm*, lo cual favorece la permanencia de la bacteria y su resistencia a los desinfectantes en la industria, pone en evidencia la participación potencial de estos microorganismos en intoxicaciones alimentarias. De este modo, si bien no afecta a la salud del animal, en situaciones de riesgo, tales como leche con recuentos bacterianos totales superiores a los niveles regulados y almacenamiento a temperaturas inapropiadas, consideramos que el control de contaminación con SCN podría ser importante para proteger la salud humana.

Observamos que los mecanismos de transferencia horizontal podrían explicar la elevada distribución de amplicones asociados a genes de resistencia a β -lactámicos, *blaZ* y *mecA*, detectada entre las cepas analizadas, esto alerta la necesidad de un control en el uso indiscriminado de este tipo de antibióticos. La presencia de cepas heterorresistentes a la oxacilina entre los SCN analizados podría estar enmascarando el reservorio del elemento genético móvil SCCmec con el riesgo de una potencial emergencia de SCN meticilino-resistentes.

En lo referente a una posible asociación entre las cepas productoras de *biofilm* y aquellas no productoras o débilmente productoras con los perfiles genotípicos y fenotípicos de resistencia antimicrobiana, se pudo observar una tendencia en donde la menor resistencia a β -lactámicos podría estar compensada por la protección que ofrece el crecimiento en *biofilm*.

Considerando la importancia de la colonización celular, se observó la capacidad de adherencia, internalización y supervivencia intracelular entre diferentes especies dentro del heterogéneo grupo de los SCN. Teniendo en cuenta que la supervivencia de *S. xylosus* en células MAC-T fue significativamente superior a la observada para las demás especies y que la literatura no cita trabajos donde se evalúe la capacidad de supervivencia intracelular de SCN, destacamos como novedosos los resultados obtenidos en este estudio.

En cuanto a la capacidad de formación de *biofilm* del total de aislamientos, no se encontró una relación entre este factor de virulencia y la capacidad de la bacteria de adherirse a las células epiteliales MAC-T, ni de sobrevivir en su interior. Sin embargo, aquellas bacterias que presentan una menor capacidad de formación de *biofilm* mostraron una capacidad de internalizar en las células epiteliales MAC-T significativamente mayor. Estos resultados indicarían que las cepas que producen

biofilm invaden a las células epiteliales con menor eficiencia que las cepas que no forman *biofilm*, sugiriendo que aquellas cepas que tienen la capacidad de invadir no necesitan la formación de *biofilm* para sobrevivir en el huésped. Esta tendencia de menor invasividad de las cepas con mayor capacidad de forma *biofilm* también se observó cuando se hizo el análisis entre cepas pertenecientes a las especies *S. chromogenes* y *S. xylosus*.

En relación a la infección experimental de células epiteliales MAC-T con diferentes especies de SCN, se destaca la respuesta inmune exacerbada a la cepa *S. xylosus* 222 en comparación con las demás cepas estudiadas y con los controles de estimulación evaluados, (LPS, LTA y lisados celulares de *E. coli* y *S. aureus*). Estos resultados determinan su potencial como candidata para obtener antígenos vacunales, principal objetivo de este trabajo.

Se llevó a cabo la evaluación de la producción de la cinética de citoquinas frente a la infección, obteniéndose una respuesta estadísticamente significativa para IL-6 al a las 24 hs de infección, como así también para para las fracciones de cultivo bacteriano evaluadas. Sin embargo, el pellet concentrado de la matriz de *biofilm*, resultó ser el único que indujo una respuesta superior incluso al control de estimulación con LPS. Se concluyó que la mayor respuesta inmune se obtuvo luego de 24 hs post-infección y con la fracción de cultivo que contenía la matriz concentrada de *biofilm* bacteriano.

Respecto a los estudios realizados en cuanto a la composición de *biofilm*, teniendo en cuenta la diferencia por especie, se muestra una tendencia marcada, donde *S. chromogenes* parece producir biopelículas mayoritariamente polisacáridicas, para *S. haemolyticus* la distribución fue homogénea en ambos grupos, mientras que para *S. xylosus* el 100 % de las cepas mostraron un porcentaje de disrupción elevado con agentes anti proteínicos y a su vez una marcada diferencia con la baja disrupción con metaperiodato. La cepa con una matriz de composición mayoritariamente proteica fue *S. xylosus* 222, la cual sigue destacándose como la candidata de elección a los fines de este trabajo.

Con el fin de probar el inmunógeno obtenido a partir del pellet concentrado de la matriz de *biofilm* de la cepa *S. xylosus* 222, que demostró una mayor capacidad de inducir una respuesta *in vitro*, se realizó el ensayo *in vivo*. La inmunización *in vivo* con este antígeno tanto en formulaciones con Quitosano como con Hidróxido de Aluminio, provocó una buena respuesta humoral contra los componentes del *biofilm* de SCN en el grupo de animales vacunados que se diferenció significativamente de la obtenida en los

grupos control. Esta observación destaca resultados novedosos obtenidos en esta tesis y la necesidad de seguir investigando sobre estrategias para potenciar la respuesta inmune empleando diversos antígenos y adyuvantes.

En relación a la evaluación de la cinética de anticuerpos en sueros de bovinos, la vacunación mostró una respuesta humoral elevada y sostenida hasta el día 28 post-parto, lo cual evidencia la llegada de las Igs al a la GM. Si bien la respuesta no se sostuvo en el tiempo, ya que en el día 60 post-parto no se pudo observar una diferencia significativa entre grupos control y vacunados, la misma permitiría dar protección en el periodo del peri parto, que es el de mayor susceptibilidad del animal y riesgo de padecer IIM.

En conjunto, los aportes de esta Tesis consistieron en la caracterización de las cepas de SCN, demostrando las diferencias en la patogenicidad de las mismas y su capacidad de interactuar con las células huésped, lo cual permitió seleccionar a *S. xylosum* 222 como candidata vacunal, evaluando la acción inmunomoduladora de distintos adyuvantes sobre la respuesta inmune generada por la vacuna. Considerando que la mastitis bovina es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial y en especial para la cuenca lechera donde se realizó este estudio, consideramos fundamentales los avances en la caracterización de las cepas causantes de la enfermedad y de la respuesta inmune inducida por las mismas en el huésped.

BIBLIOGRAFÍA

ABC Rural, 2019 <https://elabcrural.com/cordoba-la-provincia-mas-lechera/>.

Adesiyun, A. A., Webb, L. A., & Romain, H. T. (1998). Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection*, 61(5), 629-632.

Aitken S.L, Corl C.M, & Sordillo L.M. (2011). Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 16: 291- 304.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.

Almeida, R.A., Matthews, K.R., Cifrian, E., Guidry, A.J., & Oliver, S.P., (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. 79, 1021–1026.

Almeida, R. A., & Oliver, S. P. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 31(5), 205-212.

Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W., & Hennink, W. E. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1):59-82

Anaya-López, J. L., Contreras-Guzmán, O. E., Cárabez-Trejo, A., Baizabal-Aguirre, V. M., López-Meza, J. E., Valdez-Alarcón, J. J., & Ochoa-Zarzosa, A. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 358-361.

Andresen, H. (2001). Mastitis: prevención y control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 55-64.

Arca, H. C., Günbeyaz, M., & Senel, S. (2009). Chitosan-based systems for the delivery

of vaccine antigens. *Expert Review of Vaccines*, 8(7), 937–53.

Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in *biofilm*: structural and regulatory aspects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 7.

Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 1-14.

Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K. I., Oguchi, A., & Kuroda, H. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet*, 359(9320), 1819-1827.

Baggiolini, M., Walz, A., & Kunkel, S. L. (1989). Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 84(4), 1045-1049.

Bannerman, T. L., Kleeman, K. T., & Kloos, W. E. (1993). Evaluation of the Vitek Systems Gram-Positive Identification card for species identification of coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1322-1325.

Bannerman, D.D., Paape, M.J., Lee, J.W., Zhao, X., Hope, J.C., & Rainard, P. (2004). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11(3), 463-472.

Bannerman, D. D. (2009). Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 87 (suppl_13), 10-25.

Bardiau, M., Detilleux, J., Farnir, F., Mainil, J. G., & Ote, I. (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 169(1), 74-79.

Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine

Staphylococcus aureus mastitis. Journal of Dairy Science, 89(6), 1877-1895.

Barkema, H. W., Green, M. J., Bradley, A. J., & Zadoks, R. N. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. Journal of Dairy Science, 92(10), 4717-4729.

Barros, E. M., Iório, N. L. P., de Freire Bastos, M. D. C., dos Santos, K. R. N., & Giambiagi-deMarval, M. (2007). Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 59(3), 251-257.

Basanisi, M.G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, I., & La Salandra, G. (2017). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. Food Microbiology, 62: 141–146..

Bayles, K. W., Wesson, C. A., Liou, L. E., Fox, L. K., Bohach, G. A., & Trumble, W. R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infection and Immunity, 66(1), 336-342.

Becker, K., Roth, R., & Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. Journal of Clinical Microbiology, 36(9), 2548-2553.

Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R., & Kriegeskorte, A. (2014). Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the “mec alphabet” with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. International Journal of Medical Microbiology, 304(7), 794-804.

Becker, K., Both, A., Weißelberg, S., Heilmann, C., & Rohde, H. (2020). Emergence of coagulase-negative *staphylococci*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 18(4):349-366.

Bedidi-Madani, N., Greenland, T., & Richard, Y. (1998). Exoprotein and slime production by coagulase-negative *staphylococci* isolated from goats' milk. Veterinary

Microbiology, 59(2), 139- 145.

Bennett, R. W. (1996). Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? An update. Journal of food protection, 59(10), 1123-1126.

Bergdoll, M.S. (1979). Staphylococcal intoxications. En: Riemann, H., Bryan, F.L, eds. Food borne infections and intoxications. 2nd ed. New York: Academic Press

Bergdoll, M., Reiser, R., Crass, B., Robbins, R., & Davis, J. (1981). A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. The Lancet, 317(8228), 1017-1021.

Berglund, L., Björling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Szigyarto, C. A. K., & Lundberg, E. (2008). A genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. Molecular & Cellular Proteomics, 7(10), 2019-2027.

Bes M., Guérin-Faubleé V., Meugnier H., Etienne J., & Freney J. (2000). Improvement of the identification of *Staphylococci* isolated from bovine mammary infections using molecular methods. Veterinary Microbiology 71: 287-294.

Besser T. E., McGuire T. C., Gay C. C., & Pritchett L. C. (1988). Transfer of functional immunoglobulin G (IgG) antibody into the gastrointestinal tract accounts for IgG clearance in calves. J Virol 62(7):2234-2237.

Biddle, M. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gaskins, C. T., & Evans, M. A. (2004). Effects of storage time and thawing methods on the recovery of *Mycoplasma* species in milk samples from cows with intramammary infections. Journal of Dairy Science, 87(4), 933-936.

Bjorland J., Steinum T., Kvitle B., Waage S., Sunde M., & Heir E. (2005). Widespread distribution of disinfectant resistance genes among *Staphylococci* of bovine and caprine origin in Norway. Journal of Clinical Microbiology. 43: 4363-4368.

Bochniarz, M., Wawron, W., & Szczubiał, M. (2013). Coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) as an aetiological factor of mastitis in cows. Polish journal of veterinary sciences, 16(3), 487-492.

Boerhout, E., Vrieling, M., Benedictus, L., Daemen, I., Ravesloot, L., Rutten, V., ... & Eisenberg, S. (2015). Immunization routes in cattle impact the levels and neutralizing capacity of antibodies induced against *S. aureus* immune evasion proteins. *Veterinary research*, 46(1), 115.

Boerhout, E. M., Koets, A. P., Mols-Vorstermans, T. G., Nuijten, P. J., Hoeijmakers, M. J., Rutten, V. P., & Bijlsma, J. J. (2018). The antibody response in the bovine mammary gland is influenced by the adjuvant and the site of subcutaneous vaccination. *Veterinary research*, 49(1), 25.

Bonetto C. C. (2010). *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados a partir de tambos de la cuenca lechera de Villa María: prevalencia y susceptibilidad a antibióticos. Tesis de posgrado MSc. en Biotecnología. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Bonetto, C. C. (2014). Mastitis bovina causada por *Staphylococcus* coagulasa negativos - Tesis Doctoral en Ciencia Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Borst, D. W., & Betley, M. J. (1994). Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infection and Immunity*, 62(1), 113-118.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Braem, G., De Vlieghe, S., Supré, K., Haesebrouck, F., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2011). (GTG) 5-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine milk and teat apices: A comparison of type strains and field isolates. *Veterinary Microbiology*, 147(1), 67-74.

Breyne, K., De Vlieghe, S., De Visscher, A., Piepers, S., & Meyer, E. (2015). A pilot study using a mouse mastitis model to study differences between bovine associated coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of dairy science*, 98(2), 1090-1100.

Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial *biofilms* to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.

Brizzio A. A. (2009) Aplicación de una PCR múltiple para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* toxigénicas. Tesis de Maestría en Microbiología Molecular 2009. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y Universidad Nacional de San Martín.

Burgui, S. (2018). Evaluation of new strategies to combat *Staphylococcus aureus* biofilm mediated infections in medical devices. (Doctoral dissertation, Universidad Pública de Navarra).

Burton, J. L., & Erskine, R. J. (2003). Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 19(1), 1-45.

Büttner, H., Mack, D., & Rohde, H. (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5, 14.

Calloway, C. D., Schultz, L. G., Chigerwe, M., Larson, R. L., Youngquist, R. S., & Steevens, B. J. (2008). Determination of serologic and colostral response in late-gestation cows vaccinated with a *Mycoplasma bovis* bacterin. *American journal of veterinary research*, 69(7), 912-915.

Calsolari, R. A. O., Pereira, V. C. P., Júnior, J. P. A., & Cunha, M. L. R. S. (2011). Determination of toxigenic capacity by RT-PCR in coagulase-negative *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiology Immunology*, 55, 394-407.

Calvinho, L. F., Vitulich, C. A., Zurbriggen, M. A., Canavesio, V. R., & Tarabla, H. D. (1991). Prevalencia de microorganismos patógenos de la ubre en rodeos de la cuenca lechera santafesina. *Therios*, 18, 188-196.

Calvinho, L., & Vet, M. (2001). Diagnóstico bacteriológico de mastitis y su importancia en los programas de control. Disponible desde Internet en http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/diagnostico_de_mastitis_hm.pdf (Brasil) (con acceso 2/09/2011).

Calvinho, L. F., & Tirante, L. (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*, 8, 1-8.

- Calvinho, L. F. (2019). Mastitis bovina: evolución del control en Argentina y nuevos horizontes de investigación. *Anales de la ANAV*, 70.
- Camussone, C. M., & Calvinho, L. F. (2013). Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. *Revista argentina de Microbiología*, 45(2), 119-130.
- Camussone, C. M., Veaute, C. M., Porporatto, C., Morein, B., Marcipar, I. S., & Calvinho, L. F. (2013). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *Journal of dairy research*, 80(1), 72-80.
- Camussone, C. M., Veaute, C. M., Pujato, N., Morein, B., Marcipar, I. S., & Calvinho, L. F. (2014). Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. *Research in veterinary science*, 96(1), 86-94.
- Cantón, R., & Morosini, M. I. (2011). Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 977-991.
- Capurro, A., Artursson, K., Waller, K. P., Bengtsson, B., Ericsson- Unnerstad, H., & Aspán, A. (2009). Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and *tuf* gene sequence-based genotyping for species- level identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134(3), 327-333.
- Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2005). Quantitative analysis of adhesion and *biofilm* formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in microbiology*, 156(4), 506-514.
- Cerca, N., Jefferson, K. K., Oliveira, R., Pier, G. B., & Azeredo, J. (2006). Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a *biofilm* or in the planktonic state. *Infection and immunity*, 74(8), 4849-4855.
- Chaffer, M., Leitner, G., Winkler, M., Glickman, A., Krifucks, O., Ezra, E., & Saran, A. (1999). Coagulase negative *Staphylococci* and Mammary Gland Infections in Cows.

Zoonoses and Public Health, 46(10), 707-712.

Chaignon, P., Sadovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. B., & Jabbouri, S. (2007). Susceptibility of staphylococcal *biofilms* to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(1), 125-132.

Chang, B. S., San Moon, J., Kang, H. M., Kim, Y. I., Lee, H. K., Kim, J. D., ... & Park, Y. H. (2008). Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine*, 26(17), 2081-2091.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006.

Christensen, F. R., Kristensen, G. H., & la Cour Jansen, J. (1989). *Biofilm* Structure—An Important and Neglected Parameter in Waste Water Treatment. *Water Science and Technology*, 21(8- 9), 805-814.

Christner, M., Franke, G. C., Schommer, N. N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., & Aepfelbacher, M. (2010). The giant extracellular matrix binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates *biofilm* accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular microbiology*, 75(1), 187-207.

Coelho, S. D. M. D. O., Pereira, I. A., Soares, L. D. C., Pribul, B. R., & Souza, M. M. S. D. (2011). Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3305-3310.

Concha, C. (1986). Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions--a review of the literature. *Nordisk veterinærmedicin*, 38(5), 257-272.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial *biofilms*. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.

- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial *biofilms*: a common cause of persistent infections. *Science* (New York, N.Y.), 284(5418), 1318–1322.
- Couto, I., Pereira, S., Miragaia, M., Sanches, I. S., & de Lencastre, H. (2001). Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3099-3103.
- Cremonesi, P., Perez, G., Pisoni, G., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M., & Castiglioni, B. (2007). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Letters in applied microbiology*, 45(6), 586-591.
- Cucarella, C., Tormo, M. Á., Úbeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., & Penadés, J. R. (2004). Role of *biofilm*-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2177-2185.
- Cunha, M. D. L. R. D., Peresi, E., Calsolari, R. A. O., & Araújo Júnior, J. P. (2006). Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1), 70-74.
- da Costa Krewer, C., Amanso, E. S., Gouveia, G. V., de Lima Souza, R., Da Costa, M. M., & Mota, R. A. (2015). Resistance to antimicrobials and *biofilm* formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, 47(3), 511-518.
- Darwish, S. F., & Asfour, H. A. (2013). Investigation of *biofilm* forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Davenport, D. S., Massanari, R. M., Pfaller, M. A., Bale, M. J., Streed, S. A., & Hierholzer Jr, W. J. (1986). Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Infectious Diseases*, 153(2), 332-339.
- Davidson, T. J., Dohoo, I. R., Donald, A. W., Hariharan, H., & Collins, K. (1992). A cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince Edward Island. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56(4), 275.

Daw K., Baghdayan A. S., & Awasthi S.S. N. (2012). *Biofilm* and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes *in vitro*. *FEMS Medical Microbiology and Immunology*, 65(2), 270–282.

Daza Pérez, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información terapéutica del sistema nacional de salud*, 22(3), 57-67..

de Castro Melo P., Ferreira L. M., Filho A. N., Zafalon L. F., Vicente H. I., & de Souza V. (2013). Comparison of methods for the detection of *biofilm* formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 119-24.

de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C., & Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*, 96(5), 2866-2872.

De Oliveira, A. P., Watts, J. L., Salmon, S. A., & Aarestrup, F. M. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 855-862.

De Visscher, A., Supré, K., Haesebrouck, F., Zadoks, R. N., Piessens, V., Van Coillie, E., & De Vlieghe, S. (2014). Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative *Staphylococci* in dairy cattle. *Veterinary microbiology*, 172(3-4), 466-474.

De Vlieghe, S., Laevens, H., Devriese, L. A., Opsomer, G., Leroy, J. L. M., Barkema, H. W., & de Kruif, A. (2003). Parturition teat apex colonization with *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers is associated with low somatic cell count in early lactation. *Veterinary Microbiology*, 92(3), 245-252.

De Vlieghe, S., Opsomer, G., Vanrolleghem, A., Devriese, L. A., Sampimon, O. C., Sol, J., & de Kruif, A. (2004). *In vitro* growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Veterinary Microbiology*, 101(3), 215-221.

- De Vliegheer, S., Zadoks, R. N., & Barkema, H. W. (2009). Heifer and CNS mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134:1-2.
- De Vliegheer, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H.W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1025–1040.
- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., & Khafipour, E. (2018). Invited review: microbiota of the bovine udder: contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of dairy science*, 101(12), 10605-10625.
- Detilleux, J. C., Kehrl Jr, M. E., Stabel, J. R., Freeman, A. E., & Kelley, D. H. (1995). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 44(3-4), 251-267.
- Dhanawade, N. B., Kalorey, D. R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S. B., & Kurkure, N. V. (2010). Detection of intercellular adhesion genes and *biofilm* production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*, 34(1), 81-89.
- Dieser, S., Reinoso, E., Bello, C., Bonetto, C., Odierno, L., Bogni, C., & Raspanti, C. (2009). Genotypic and phenotypic typing methods of coagulase negative *Staphylococci* isolated from bovine milk. *Biocell*, 33 (2), 96.
- Dieser, S. A., Vissio, C., Lasagno, M. C., Bogni, C. I., & Larriestra, A. J. (2014). Prevalence of pathogens causing subclinical mastitis in Argentinean dairy herds. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(1): 124-126.
- Dinges M. M., Orwin P. M., & Schlievert P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13:16–34.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). *Biofilms*: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- dos Santos Nascimento, J., dos Santos, K. R. N., Gentilini, E., Sordelli, D., & de Freire

- Bastos, M. D. C. (2002). Phenotypic and genetic characterisation of bacteriocin-producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 85(2), 133-144.
- Drancourt, M., & Raoult, D. (2002). *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1333-1338.
- Elhadidy, M., & Elsayyad, A. (2013). Uncommitted role of enterococcal surface protein, Esp, and origin of isolates on *biofilm* production by *Enterococcus faecalis* isolated from bovine mastitis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(2), 80-84.
- El-Jakee, J. K., Aref, N. E., Gomaa, A., El-Hariri, M. D., Galal, H. M., Omar, S. A., & Samir, A. (2013). Emerging of coagulase negative *Staphylococci* as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 74-78.
- Ezzat Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2014). The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *Journal of veterinary medicine*, 2014.
- Fabres-Klein, M. H., Aguilar, A. P., Silva, M. P., Silva, D. M., & Ribon, B. (2014). Moving towards the immunodiagnosis of staphylococcal intramammary infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(12), 2095.
- Fagerlund, A., Langsrud, S., Heir, E., Mikkelsen, M. I., & Møretrø, T. (2016). *Biofilm* matrix composition affects the susceptibility of food associated *Staphylococci* to cleaning and disinfection agents. *Frontiers in microbiology*, 7, 856.
- Federation of Animal Science Societies, FASS. (1999). *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. Federation of Animal Sciences Societies, Champaign, Illinois, EE.UU.
- Felipe, V., Morgante, C. A., Icely, P. A., Correa, S. G., & Porporatto, C. (2010). Actividad antimicrobiana de Quitosano: Efecto sobre la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales de la glándula mamaria bovina. *Revista*

Argentina de Microbiología, 42(1), 73.

Felipe, V., Somale, P., Varroni, F., Morgante, C., & Porporatto, C. (2013). Capacidad formadora de *biofilm* en aislamientos bovinos de *Staphylococcus aureus*. Revista Argentina de Microbiología, 45(1), 24–25.

Felipe, V. (2015). “Respuesta inmunológica e interacción microbiana en glándula mamaria bovina (bos taurus): efecto del polisacárido quitosano” Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Cordoba.

Felipe, V., Morgante, C. A., Somale, P. S., Varroni, F., Zingaretti, M. L., Bachetti, R. A., & Porporatto, C. (2017). Evaluation of the *biofilm* forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. Microbial Pathogenesis, 104, 278-286.

Felipe V., Breser M. L., Bohl L. P., Rodrigues da Silva E., Morgante C. A., Correa S. G., & Porporatto C. (2019). Chitosan disrupts *biofilm* formation and promotes *biofilm* eradication in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. International Journal of Biological Macromolecules. 126:60-67.

Ferreira, J. S., Costa, W. L. R., Cerqueira, E. S., Carvalho, J. S., Oliveira, L. C., & Almeida, R. C. C. (2014). Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil. Food Control, 37, 395-400.

Fijałkowski, K., Struk, M., Karakulska, J., Paszkowska, A., Giedrys-Kalemba, S., Masiuk, H., ... & Nawrotek, P. (2014). Comparative analysis of superantigen genes in *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* isolates collected from a single mammary quarter of cows with mastitis. Journal of Microbiology, 52(5), 366-372.

Fitzpatrick, F., Humphreys, H., & O'Gara, J. P. (2005). Evidence for *icaADBC*-independent *biofilm* development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Journal of clinical microbiology, 43(4), 1973-1976.

Fournier, C., Kuhnert, P., Frey, J., Miserez, R., Kirchhofer, M., Kaufmann, T., & Graber, H. U. (2008). Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Research in Veterinary Science, 85(3), 439-448.

- Fox, L. K., Kirk, J. H., & Britten, A. (2005). *Mycoplasma mastitis*: a review of transmission and control. *Zoonoses and Public Health*, 52(4), 153-160.
- Fox, L. K. (2009). Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 82-88.
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780-13785.
- Fraunholz, M., & Sinha, B. (2012). Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.
- Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flægstad, T., & Sollid, J. E. (2009). *Biofilm* formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of clinical microbiology*, 47(4), 1172-1180.
- Freick, M., Frank, Y., Steinert, K., Hamedy, A., Passarge, O., & Sobiraj, A. (2016). Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, 44(04), 219-229.
- Fueyo, J. M., Mendoza, M. C., & Martín, M. C. (2005). Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microbes and Infection*, 7(2), 187-194.
- Gay C.C. (1984). The role of colostrum in managing calf health. *Proc Am Assoc Bovine Pract* 16:79-84.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Fermepin, M. R., & De Torres, R. A. (2002). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 85(8), 1913-1917.
- Geraghty, L., Booth, M., Rowan, N., & Fogarty, A. (2013). Investigations on the efficacy of routinely used phenotypic methods compared to genotypic approaches for

the identification of staphylococcal species isolated from companion animals in Irish veterinary hospitals. *Irish Veterinary Journal*. 66, 7. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-66-7>.

Gerdts, V., Mutwiri, G., Richards, J., van Drunen Littel-van den Hurk, S., & Potter, A.a. (2013). Carrier molecules for use in veterinary vaccines. *Vaccine*, 31(4), 596–602.

Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. (1998). Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-18593.

Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., & König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, *16S* rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1019-1025.

Gil, M., Merchán, K., Quevedo, G., Sánchez, A., Nicita, G., Rojas, T., ... & Finol, M. (2015). Formación de biopelículas en aislados de *Staphylococcus aureus* según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. *Vitae*, (62).

Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., DeBoy, R. T., Ravel, J., & Dodson, R. J. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2426-2438.

Gillespie, B. E., Headrick, S. I., Boonyayatra, S., & Oliver, S. P. (2009). Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 65-72.

Goh, S. H., Santucci, Z., Kloos, W. E., Faltyn, M., George, C. G., Driedger, D., & Hemmingsen, S. M. (1997). Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3116- 3121.

Gonzalez, R. N., Giraud, J. A., & Busso, J. J. (1980). Investigación de mastitis

subclínicas: II Agentes etiológicos bacterianos. *Revista Medicina Veterinaria (Bs. As.)*, 61, 225-234.

Guimarães F.F., Joaquim S.F., Manzi M.P., Silva R.C., Bruder- Nascimento A.C.M.O., Costa E.O. & Langoni H. (2016). Comparison phenotypic and genotypic identification of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(12):1160-1164.

Guy, B., & Burdin, N. (2005). New adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Therapies*, 60(3), 235-241.

Hair, P.S., Echague, C.G., Sholl, A.M., Watkins, J.A., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., & Cunnion, K.M., (2010). Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infection Immunology Journal* 78, 1717–1727.

Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *The Veterinary Quarterly*, 29(1), 18–31.

Hanssen, A. M., Kjeldsen, G., & Sollid, J. U. E. (2004). Local variants of staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci*: evidence of horizontal gene transfer?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 285-296.

Harro, J. M., Peters, B. M., O'May, G. a, Archer, N., Kerns, P., Prabhakara, R., & Shirtliff, M. E. (2010). Vaccine development in *Staphylococcus aureus*: taking the *biofilm* phenotype into consideration. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 306–323.

Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L., & Pyörälä, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 993- 1000.

Haveri, M., Suominen, S., Rantala, L., Honkanen-Buzalski, T., & Pyörälä, S. (2005). Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Veterinary*

microbiology, 106(1-2), 97-102.

Hebert, A., Sayasith, K., Senechal, S., Dubreuil, P., & Lagace, J., (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. FEMS Microbiology Letters. 193, 57–62.

Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A., & Fluit, A. C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species- level identification of clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococci*. Journal of Clinical Microbiology, 43(5), 2286- 2290.

Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F., & Götz, F. (1996). Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in *biofilm* formation. Infection and immunity, 64(1), 277-282.

Hermans K, Devriese LA, & Haesebrouck. (2004). 4 *Staphylococcus*. En: Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3rd ed. USA: Blackwell Publishing. pp 43 – 52.

Hertl, J. A., Schukken, Y. H., Welcome, F. L., Tauer, L. W., & Gröhn, Y. T. (2014). Effects of pathogen-specific clinical mastitis on probability of conception in Holstein dairy cows. Journal of dairy science, 97(11), 6942-6954.

Hogan, J. S., Pankey, J. W., & Smith, K. L. (1987). *Staphylococcus* species other than *Staphylococcus aureus*. In Annual meeting- National Mastitis Council, Inc (USA).

Hogeveen, H., Huijps, K., & Lam, T. J. G. M. (2011). Economic aspects of mastitis: new developments. New Zealand Veterinary Journal, 59(1), 16–23.

Holtfreter, S., & Broker, B. M. (2005). Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz), 53(1), 13-27.

Hosseinzadeh, S., & Dastmalchi Saei, H. (2014). Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: emerging of coagulase-negative *Staphylococci*. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 2(1), 27-34.

Howard, C. J. (1984). Comparison of bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of *Mycoplasma bovis* by bovine alveolar macrophages and neutrophils.

Veterinary immunology and immunopathology, 6(3-4), 321-326.

Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3(4), 442-474.

Hussain M., Herrmann M., von Eiff C., Perdreau-Remington F., & Peters G. (1997). A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infection and immunity*, 65(2), 519-524.

Hyvönen, P., Käyhkö, S., Taponen, S., von Wright, A., & Pyörälä, S. (2009). Effect of bovine lactoferrin on the internalization of coagulase-negative *Staphylococci* into bovine mammary epithelial cells under in-vitro conditions. *Journal of Dairy Research*, 76(2), 144-151.

Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., & Makino, S. I. (2005). Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2793-2795.

Imran M., Jones D., & Smith H (2005) *Biofilms* and the plasmid maintenance question. *Math Bioscience* 193:183.

InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) Microorganism in Foods 5, Microbiological Specifications of Food Pathogens, (1996).. London, Blackie Academic and Professionalp. 299-333.

Ishikawa H. (1987). Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Nihon Juigaku Zasshi*, 49(3):469-75. Ismail, Z. B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary world*, 10(9), 1057.

Ismail, Z. B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary world*, 10(9), 1057.

Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., & Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette

chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1323-1336.

Izano, E. A., Sadovskaya, I., Wang, H., Vinogradov, E., Rangunath, C., Ramasubbu, N., . & Kaplan, J. B. (2008). Poly-N-acetylglucosamine mediates *biofilm* formation and detergent resistance in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial pathogenesis*, 44(1), 52-60.

Jabbouri, S., & Sadovskaya, I. (2010). Characteristics of the *biofilm* matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 280-291.

Janda, J. M. (1986). Elastolytic activity among *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(6), 945-946.

Jenkins, S. N., Okello, E., Rossitto, P. V., Lehenbauer, T. W., Champagne, J., Penedo, M. C., . & Timms, L. L. (2019). Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. *PeerJ*, 7, e6749.

Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R., & Rozee, K. R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 426-430.

Josse, J., Laurent, F., & Diot, A. (2017). Staphylococcal adhesion and host cell invasion: Fibronectin-binding and other mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2433.

Kaliwal, B. B., Sadashiv, S. O., Kurjogi, M. M., & Sanakal, R. D. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Veterinary World*, 4(4), 158-161.

Kateete, D.P., Kabugo, U., Baluku, H., Nyakarahuka, L., Kyobe, S., Okee, M., Najjuka, C.F., & Joloba, M.L. (2013) Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda.

PLoS One. 2013; 8: e63413

Keefe, G. (2012). Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2):203-16.

Kehrli, M. E., Nonnecke, B. J., & Roth, J. A. (1989). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *American journal of veterinary research*, 50(2), 215.

Kelly-Quintos, C., Kropec, A., Briggs, S., Ordonez, C. L., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2005). The role of epitope specificity in the human opsonic antibody response to the staphylococcal surface polysaccharide poly N-acetyl glucosamine. *The Journal of infectious diseases*, 192(11), 2012-2019.

Khoramrooz, S. S., Mansouri, F., Marashifard, M., Hosseini, S. A. A. M., Chenarestane-Olia, F. A., Ganavehei, B., ... & Darban-Sarokhalil, D. (2016). Detection of *biofilm* related genes, classical enterotoxin genes and *agr* typing among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine with subclinical mastitis in southwest of Iran. *Microbial Pathogenesis*, 97, 45-51.

Kim, D. W., Khalmuratova, R., Gu Hur, D., Jeon, S. Y., Kim, S. W., Shin, H. W., ... & Rhee, C. S. (2011). *Staphylococcus aureus* enterotoxin B contributes to induction of nasal polypoid lesions in an allergic rhinosinusitis murine model. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 25(6), e255-e261.

Klingenberg, C., Rønnestad, A., Anderson, A. S., Abrahamsen, T. G., Zorman, J., Villaruz, A., ... & Sollid, J. E. (2007). Persistent strains of coagulase-negative *Staphylococci* in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(11), 1100-1111.

Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A., & Jabbouri, S. (2006). *Biofilms* of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS microbiology letters*, 255(1), 11-16.

Kot, B., Piechota, M., Wolska, K. M., Frankowska, A., Zdunek, E., Binek, T., & Antosiewicz, M. (2012). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of

- Staphylococci* from bovine milk. Polish Journal of Veterinary Sciences, 15(4), 677-683.
- Landin, H., Mörk, M. J., Larsson, M., & Waller, K. P. (2015). Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. Acta Veterinaria Scandinavica, 57(1), 81.
- Lange, C.C., Brito, M.A., Reis, D.R., Machado, M.A., Guimarães, A.S., Azevedo, A.L., Salles, É.B., Alvim, M.C., Silva, F.S., & Meurer, I.R. (2015). Species-level identification of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Brazil using partial *16S* rRNA sequencing. Veterinary Microbiology, 176(3-4), 382-8.
- Langsrud, S. (2009). *Biofilm* formation by Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* and *Enterococcus spp.* in food processing environments. In *Biofilms in the food and beverage industries* (pp. 250-269). Woodhead Publishing.
- Lasagno, M., de los Angeles Navarro, M., Moliva, M., & Reinoso, E. (2019). Screening of bacteriocin associated genes of *Streptococcus uberis* strains. Heliyon, 5(9), e02393.
- Le Loir Y., Baron F., & Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and. Molecular Biology. Res. 2:63–76.
- Lechería Argentina, Anuario (2014), <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/lecheria.pdf>.
- Lee, J. W., O'Brien, C. N., Guidry, A. J., Paape, M. J., Shafer-Weaver, K. A., & Zhao, X. (2005). Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. Canadian journal of veterinary research, 69(1), 11.
- Leigh, J. A. (2002). Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. In *Biology of the Mammary Gland* (pp. 307-311). Springer US.
- Leitner, G. L. U. B., Lubashevsky, E., & Trainin, Z. (2003). *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model. Veterinary immunology and immunopathology, 93(3-4), 159-167.

Leke, A., Goudjil, S., Mullie, C., Grognet, S., & Biendo, M. (2017). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes and exfoliative toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains from raw human breast milk. *Clinical Nutrition Experimental*, 14, 26-35.

Logan E. F., & Penhale W. J. (1972). Studies on the immunity of the calf to colibacillosis. V. The experimental reproduction of enteric colibacillosis. *Vet Rec* 91(18):419-423,

López C., Feltri A., Leotta G. A., González G., Manfredi E., Gottardi G., Elder M., De Las Carreras S., Patri C., Guajardo F., San Martín A., & Rivas M. (2008). Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 198-203.

López Meza, J. E., Higuera Ramos, J. E., Ochoa Zarzosa, A., Chassin Noria, O., Valdez Alarcón, J. J., Bravo Patiño, A., & Baizabal Aguirre, V. M. (2006). Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus spp.* asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Técnica Pecuaria en México*, 44(1).

Luppens, S. B., Reij, M. W., van der Heijden, R. W., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2002). Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus biofilm* cells to disinfectants. *Applied Environmental Microbiology*., 68(9), 4194-4200.

Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., & Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in *biofilm* accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of bacteriology*, 178(1), 175-183.

Madsen, S. A., Weber, P. S., & Burton, J. L. (2002). Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(3-4), 159-175.

Mah, T. F. (2012). *Biofilm*-specific antibiotic resistance. *Future microbiology*, (9), 1061-1072.

Mahato, S., Mistry, H. U., Chakraborty, S., Sharma, P., Saravanan, R., & Bhandari, V.

(2017). Identification of variable traits among the methicillin resistant and sensitive coagulase negative *Staphylococci* in milk samples from mastitic cows in India. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1446.

Mahmoud, A. M., Albadawy, H. S., Bolis, S. M., Bilal, N. E., Ahmed, A. O., & Ibrahim, M. E. (2015). Inducible clindamycin resistance and nasal carriage rates of *Staphylococcus aureus* among healthcare workers and community members. *African Health Sciences*, 15(3), 861-867.

Maira-Litrán, T., Kropec, A., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (2005). Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated staphylococcal poly-N-acetyl- β -(1-6)-glucosamine. *Infection and immunity*, 73(10), 6752-6762.

Makovec, J.A., & Ruegg, P. L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, 86(11), 3466-3472.

Mallard, B. A., Dekkers, J. C., Ireland, M. J., Leslie, K. E., Sharif, S., Vankampen, C. L., . & Wilkie, B. N. (1998). Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *Journal of dairy science*, 81(2), 585-595.

Mamo, W., Fröman, G., & Wadström, T. (1988). Interaction of sub-epithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 18(2), 163-176.

Manfredi E., Leotta G. A., & Rivas M. (2010). PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Revista Argentina de Microbiología*, 42: 212-5.

Marques, V.F., Souza, M., de Mendonça, E. C., Alencar, T. A. D., Pribul, B. R., Coelho, S .D. M. D. O., & Reinoso, E. B. (2013). Phenotypic and genotypic analysis of virulence in *Staphylococcus spp.* and its clonal dispersion as a contribution to the study of bovine mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(2), 161-170.

Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., & Bergeron, M. G. (1998).

Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 618-623.

Martins, K. B., Faccioli, P. Y., Bonesso, M. F., Fernandes, S., Oliveira, A. A., Dantas, A., & Maria de Lourdes, R. S. (2017). Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 2184-2195.

Mašlanková, J., Pilipčincová, I., & Tkáčiková, Ľ. (2009). Pheno-and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates of sheep origin. *Acta Veterinaria Brno*, 78(2), 345-352.

McCormick, J. K., Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2001). Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 77-104.

McKenney, D., Hübner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (1998). The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infection and Immunity*, 66(10), 4711-4720.

Mehmeti, I., Behluli, B., Mestani, M., Ademi, A., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2016). Antimicrobial resistance levels amongst *Staphylococci* isolated from clinical cases of bovine mastitis in Kosovo. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(10), 1081-1087.

Mello, P. L., Moraes Riboli, D. F., Pinheiro, L., de Almeida Martins, L., Vasconcelos Paiva Brito, M. A., & Ribeiro de Souza da Cunha, M. D. L. (2016). Detection of enterotoxigenic potential and determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine subclinical mastitis in different Brazilian states. *Toxins*, 8(4), 104.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina (MAGyP, 2015). <http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/ss-lecheria/estadisticas/index.php>.

Mollet, C., Drancourt, M., & Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology*, 26(5), 1005-1011.

Moran HBT, Turley JL, Andersson M, Lavelle EC. (2018). Immunomodulatory

properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, 184:1-9.

Morosini, M. I., Cercenado, E., Ardanuy, C., & Torres, C. (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(6), 325-332.

National Mastitis Council, (2009) <https://www.nmconline.org/>.

Naushad, S., Naqvi, S. A., Nobrega, D., Luby, C., Kastelic, J. P., Barkema, H. W., & De Buck, J. (2019). Comprehensive virulence gene profiling of bovine non-aureus *Staphylococci* based on whole-genome sequencing data. *MSystems*, 4(2), e00098-18.

Nemati, M., Hermans, K., Lipinska, U., Denis, O., Deplano, A., Struelens, M., & Haesebrouck, F. (2008). Antimicrobial resistance of old and recent *Staphylococcus aureus* isolates from poultry: first detection of livestock-associated methicillin-resistant strain ST398. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3817-3819.

Nickerson, S. C., & Boddie, R. L. (1994). Effect of Naturally Occurring Coagulase-Negative Staphylococcal Infections on Experimental Challenge with Major Mastitis Pathogens1. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2526-2536.

Nobrega, D. B., Naushad, S., Naqvi, S. A., Condas, L. A., Saini, V., Kastelic, J. P., & Barkema, H. W. (2018). Prevalence and genetic basis of antimicrobial resistance in non-aureus *Staphylococci* isolated from Canadian dairy herds. *Frontiers in microbiology*, 9, 256.

Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology*, 48(6), 1429-1449.

Odd, G.B.; Maeland, J.A. (1997) .Mechanisms of methicilin resistance in *Staphylococci*. *AMPIS*, v.105, p.264-276.

Oliveira Calsolari, R. A. D., Pereira, V. C., Araujo Junior, J. P., de Souza da Cunha, M. D., & Ribeiro, L. (2011). Determination of toxigenic capacity by reverse transcription polymerase chain reaction in coagulase negative *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in Brazil. *Microbiology and Immunology*, 55(6), 394-407.

- Oliveira F., Lima C. A., Brás S., França A., Cerca N. (2015). Evidence for inter- and intraspecies *biofilm* formation variability among a small group of coagulase-negative *Staphylococci*. FEMS Microbiology Letters, 362(20). pii: fnv175. Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F., & Vilela, C. L. (2006). *Biofilm*-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. Veterinary Microbiology, 118(1), 133-140.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., & Vilela, C. L. (2011). Invasive potential of *biofilm*-forming *Staphylococci* bovine subclinical mastitis isolates. Journal of Veterinary Science, 12(1), 95-97.
- Oliver, S. P. (1988). Frequency of isolation of environmental mastitis-causing pathogens and incidence of new intramammary infection during the nonlactating period. American Journal of Veterinary Research, 49(11), 1789-1793.
- Oliver, S. P., & Jayarao, B. M. (1997). Coagulase Negative Staphylococcal intramammary infections in cows and heifers during the nonlactating and periparturient periods. Zoonoses and Public Health, 44(1-10), 355-363.
- Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(3), 450-460.
- Omoe, K., Hu, D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., & Shinagawa, K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infection and Immunity, 71(10), 6088-6094.
- Oniciuc, E. A., Cerca, N., & Nicolau, A. I. (2016). Compositional analysis of *biofilms* formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. Frontiers in Microbiology, 7, 390.
- Onni, T., Sanna, G., Cubeddu, G. P., Marogna, G., Lollai, S., Leori, G., & Tola, S. (2010). Identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of *16S* rRNA and *gap* genes. Veterinary microbiology, 144 (3-4), 347-352.
- Ortines, R. V., Liu, H., Cheng, L. I., Cohen, T. S., Lawlor, H., Gami, A., & Ashbaugh,

- A. G. (2018). Neutralizing alpha-toxin accelerates healing of *Staphylococcus aureus*-infected wounds in nondiabetic and diabetic mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(3), e02288-17.
- Osman, K. M., El-Razik, K. A., Marie, H. S. H., & Arafa, A. (2015). Relevance of *biofilm* formation and virulence of different species of coagulase-negative staphylococci to public health. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(10), 2009-2016.
- Otto, M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative *Staphylococci*. *Frontiers Bioscience*, 9(1), 841-863.
- Otto, M. (2008). *Staphylococcal biofilms*. In *Bacterial biofilms* (pp. 207-228). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*, 7(8), 555.
- Oviedo-Boyso, J., Barriga Rivera, J. G., Valdez Alarcón, J. J., Bravo Patiño, A., Cárabez Trejo, A., Cajero Juárez, M., & Baizabal Aguirre, V. M. (2008). Internalization of *Staphylococcus aureus* by bovine endothelial cells is associated with the activity state of NF κ B and modulated by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(2), 169-176.
- Oviedo-Boyso, J., Cortés-Vieyra, R., Huante-Mendoza, A., Hong, B. Y., Valdez-Alarcón, J. J., Bravo-Patiño, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2011). The phosphoinositide-3-kinase–Akt signaling pathway is important for *Staphylococcus aureus* internalization by endothelial cells. *Infection and Immunity*, 79(11), 4569-4577.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., & Burvenich, C. (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(2), 109-121.
- Paape, M. J., Bannerman, D. D., Zhao, X., & Lee, J. W. (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Veterinary research*, 34(5), 597-627.
- Paradis, M. È., Bouchard, E., Scholl, D. T., Miglior, F., & Roy, J. P. (2010). Effect of

nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative *Staphylococci* intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2989-2997.

Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., McGuire, M. A., Park, Y. H., Rurangirwa, F. R., & Bohach, G. A. (2011). Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary microbiology*, 147(1), 149-154.

Park, Y. K., Fox, L. K., Hancock, D. D., McMahan, W., & Park, Y. H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. *Journal of Veterinary Science*, 13(1), 103-105.

Passchyn, P., Piepers, S., & De Vliegher, S. (2011). Online mastitis survey in Flanders, Belgium: first descriptive results. In *Udder Health and Communication* (pp. 112- 112). Wageningen Academic Publishers.

Pereyra, E. A., Dallard, B. E., & Calvino, L. F. (2014). Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 363-375.

Pérez, M. M., Prenafeta, A., Valle, J., Penadés, J., Rota, C., Solano, C., & Maira-Litran, T. (2009). Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1, 6 glucosamine specific antibody production using *biofilm*-embedded bacteria. *Vaccine*, 27(17), 2379-2386.

Persson-Waller, K., Colditz, I. G., & Seow, H. F. (1997). Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Research in Veterinary Science*, 62(1), 63-66.

Philpot, W. N., & Nickerson, S. C. (1992). Mastitis: El contra ataque (No. SF 967. M3. P5418 1992).

Piccinini, R., Bronzo, V., Moroni, P., Luzzago, C., & Zecconi, A. (1999). Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *Journal of dairy research*, 66(4), 501-510.

- Piechota, M., Kot, B., Zdunek, E., Mitrus, J., Wicha, J., & Wolska, M. K. (2014). Distribution of classical enterotoxin genes in *Staphylococci* from milk of cows with and without mastitis and the cowshed environment. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(3), 407-411.
- Piepers, S., De Meulemeester, L., de Kruif, A., Opsomer, G., Barkema, H. W., & De Vliegher, S. (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 74(4), 478-483.
- Piessens, V., De Vliegher, S., Verbist, B., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., ... & Van Coillie, E. (2012). Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. *Journal of dairy science*, 95(12), 7027-7038.
- Piessens, V., Supré, K., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., De Vliegher, S., & Van Coillie, E. (2010). Validation of amplified fragment length polymorphism genotyping for species identification of bovine associated coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Microbiological Methods*, 80(3), 287-294.
- Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., & De Vliegher, S. (2011). Distribution of coagulase- negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2933-2944.
- Piette, A., & Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative *Staphylococci* in human disease. *Veterinary microbiology*, 134(1-2), 45-54.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2433-2441.
- Pizauro, L. J., de Almeida, C. C., Soltes, G. A., Slavic, D., Rossi- Junior, O. D., de Ávila, F. A., & MacInnes, J. I. (2017). Species level identification of coagulase negative *Staphylococcus spp.* From buffalo using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and *cydB* real-time quantitative PCR. *Veterinary Microbiology*, 204, 8-14.

- Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystroń, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococci*. *International journal of food microbiology*, 163(1), 34-40.
- Porporatto, C., Bianco, I. D., Riera, C. M., & Correa, S. G. (2003). Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 266–272.
- Porporatto, C., Bianco, I. D., Cabanillas, A. M., & Correa, S. G. (2004). Early events associated to the oral co-administration of type II collagen and chitosan: induction of anti-inflammatory cytokines. *International Immunology*, 16(3), 433–441.
- Porporatto, C., Bianco, I. D., & Correa, S. G. (2005). Local and systemic activity of the polysaccharide chitosan at lymphoid tissues after oral administration. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(1), 62–69.
- Porporatto, C., Canali, M. M., Bianco, I. D., & Correa, S. G. (2009a). Ability of the polysaccharide chitosan to inhibit proliferation of CD4+ lymphocytes from mucosal inductive sites, in vitro and in vivo. *Cell Proliferation*, 42(6), 780–787.
- Porporatto, C., Canali, M. M., Bianco, I. D., & Correa, S. G. (2009b). The biocompatible polysaccharide chitosan enhances the oral tolerance to type II collagen. *Clinical and Experimental Immunology*, 155(1), 79–87.
- Porporatto C, Icely P, Felipe V, Morgante C, C. S. (2011). Actividad antimicrobiana e inmunomodulatoria del polisacárido Quitosano en glándula mamaria bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 92 (3-4).
- Pospiech, A., & Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics*, 11(6), 217-218.
- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., & Costa, L. (2010). Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134(3-4), 208-217.

- Pujato, N. (2015). Desarrollo de un inmunógeno multicomponente prototípico para el control de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral.
- Pumipuntu, N., Tunyong, W., Chantratita, N., Diraphat, P., Pumirat, P., Sookrung, N., & Indrawattana, N. (2019). *Staphylococcus spp.* associated with subclinical bovine mastitis in central and northeast provinces of Thailand. PeerJ, 7, e6587.
- Pyörälä, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative *Staphylococci*-Emerging mastitis pathogens. Veterinary Microbiology, 134(1), 3-8.
- Qazi, S. N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C. E., Cockayne, A., Winzer, K., & Hill, P. J. (2001). *agr* expression precedes escape of internalized *staphylococcus aureus* from the host endosome. Infection and Immunity, 69(11), 7074-7082.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., & Qu, D. (2007). Role of autolysin-mediated DNA release in *biofilm* formation of *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology, 153(7), 2083-2092.
- Rainard, P., & Riollet, C. (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. Veterinary research, 37(3), 369-400.
- Rall, V. L. M., Sforcin, J. M., de Deus, M. F. R., de Sousa, D. C., Camargo, C. H., Godinho, N. C., & Araújo Jr, J. P. (2010). Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from Brazilian Minas cheese. Foodborne Pathogens and Disease, 7(9), 1121-1123.
- Rall, V. L. M., Miranda, E. S., Castilho, I. G., Camargo, C. H., Langoni, H., Guimarães, F. F., & Júnior, A. F. (2014). Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. Journal of Dairy Science, 97(2), 829-837.
- Randall, L. P., Lemma, F., Koylass, M., Rogers, J., Ayling, R. D., Worth, D. & Muchowski, J. (2015). Evaluation of MALDI-TOF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. Research in Veterinary Science, 101, 42- 49.

- Raspanti, C. G., Bonetto, C. C., Vissio, C., Pellegrino, M. S., Reinoso, E. B., Dieser, S. A., & Odierno, L. M. (2016). Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1), 50-56.
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 30(1), 23–32.
- Reygaert, W. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): prevalence and epidemiology issues. *Clinical Laboratory Science*, 22(2), 111.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., & Mack, D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular microbiology*, 55(6), 1883-1895.
- Riollet, C., Rainard, P., & Poutrel, B. (2000). Differential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(2), 161-167.
- Rivero, R., Zulfbey, Ch., Farias Reyes, J., & Santoro, R. (1994). Aislamiento de gram negativos en leches crudas con antibióticos. *Revista Científica*, 4(1).
- Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Guzman-Blanco, M., Mejía, C., Alvarez, C., Bavestrello, L., & Gotuzzo, E. (2010). Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(7), e560-e566.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., ... & Mack, D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular microbiology*, 55(6), 1883-1895.
- Rohde, H., Burandt, E. C., Siemssen, N., Frommelt, L., Burdelski, C., Wurster, S., ... & Knobloch, J. K. M. (2007). Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*

- isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials*, 28(9), 1711-1720.
- Rollin, E., Dhuyvetter, K. C., & Overton, M. W. (2015). The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Preventive veterinary medicine*, 122(3), 257-264.
- Rossitto, P. V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Luiz, K., Watts, J. L., & Cullor, J. S. (2002). Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in central California dairies. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 132-138.
- Rouha, H., Weber, S., Janesch, P., Maierhofer, B., Gross, K., Dolezilkoval, I., ... & Badarau, A. (2018). Disarming *Staphylococcus aureus* from destroying human cells by simultaneously neutralizing six cytotoxins with two human monoclonal antibodies. *Virulence*, 9(1), 231-247.
- Saa, E., & Kruze, J. (1994). Virulence factors of coagulase-negative *Staphylococcus* of human and bovine origin. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 37(3), 201-208.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Flahaut, S., Kogan, G., & Jabbouri, S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model *biofilm*-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infection and immunity*, 73(5), 3007-3017.
- Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., De Viegheer, S., Supre, K., Haesebrouck, F., Barkema, H. W., Lam, T. G. (2009). Performance of API Staph ID 32 and Staph-zym for identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine milk sample. *Veterinary Microbiology*, 136, 300–305.
- Sampimon, O. C., Lam, T. J. G. M., Mevius, D. J., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2011). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology*, 150(1-2), 173-179.
- Savage, E., Chothe, S., Lintner, V., Pierre, T., Matthews, T., Kariyawasam, S., ... & Jayarao, B. (2017). Evaluation of three bacterial identification systems for species identification of bacteria isolated from bovine mastitis and bulk tank milk samples. *Foodborne pathogens and disease*, 14(3), 177-187.
- Sawant, A. A., Gillespie, B. E., & Oliver, S. P. (2009). Antimicrobial susceptibility of

coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 73-81.

Scheifele, D. W., Bjornson, G. L., Dyer, R. A., & Dimmick, J. E. (1987). Delta-like toxin produced by coagulase-negative *Staphylococci* is associated with neonatal necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*, 55(9), 2268-2273.

Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 14-56.

Schommer, N. N., Christner, M., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., Aepfelbacher, M., & Rohde, H. (2011). *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of *biofilm* formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A. 1. *Infection and immunity*, 79(6), 2267-2276.

Schukken, Y. H., González, R. N., Tikofsky, L. L., Schulte, H. F., Santisteban, C. G., Welcome, F. L., & Zadoks, R. N. (2009). CNS mastitis: Nothing to worry about?. *Veterinary Microbiology*, 134(1), 9-14.

Schukken, Y. H., Günther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M. C., Goetze, L., Holst, O., ... & Smith, D. G. E. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 270-289.

Schukken, Y. H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., ... & Guix, R. (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal of dairy science*, 97(8), 5250-5264.

SECAGYP (2017) <https://www.boletinoficial.gob.ar/#!DetalleNorma/163500/20170512>

Seo, J. S., Keum, Y. S., Harada, R. M., & Li, Q. X. (2007). Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5383-5389.

Shalita, Z., Murphy, E., & Novick, R. P. (1980). Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: structural and evolutionary relationships. *Plasmid*, 3(3), 291-

311.

Silva, N. C. C., Guimarães, F. F., Manzi, M. P., Budri, P. E., Gómez-Sanz, E., Benito, D., & Torres, C. (2013). Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. *Journal of Dairy Science*, 96(11), 6856-6862.

Simojoki H., Hyvönen P., Plumed Ferrer C., Taponen S., Pyörälä S. (2012); Is the *biofilm* formation and slime producing ability of coagulase-negative *Staphylococci* associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Veterinary Microbiology* 158:344–52.

Sinha, B., François, P.P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., Krause, K.H., (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell. Microbiology*. 1, 101–117.

Sjölander, A., van't Land, B., & Bengtsson, K. L. (1997). Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cellular immunology*, 177(1), 69-76.

Smith, K. L., Todhunter, D. A., & Schoenberger, P. S. (1985). Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 68(6), 1531-1553.

Smith, K. L., & Hogan, J. S. (1993). Environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9(3), 489-498.

Soares, L. S., Almeida, R. C., Cerqueira, E. S., Carvalho, J. S., & Nunes, I. L. (2012). Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive *Staphylococci* on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. *Food Control*, 27(1), 206-213.

Somale, P., Felipe, V., Varroni, F., Morgante, C., & Porporatto, C. (2013). Formación de *biofilm* por *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33(1), 17–43.

Sordillo, L. M., & Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis

- susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2), 135-146.
- Souza, F. N., Piepers, S., Della Libera, A. M. M. P., Heinemann, M. B., Cerqueira, M. M. O. P., & De Vliegher, S. (2016). Interaction between bovine-associated coagulase-negative *Staphylococci* species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2867-2874.
- Srednik, M. E., Grieben, M. A., Bentancor, A., & Gentilini, E. R. (2015). Molecular identification of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis and detection of β -lactam resistance. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(09), 1022-1027.
- Srednik, M. E., Tremblay, Y. D., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Fernández Cirelli, A., & Gentilini, E. R. (2017). *Biofilm* formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiology Letters*, 364(8).
- Srednik, M. E., Crespi, E., Testorelli, M. F., Puigdevall, T., Pereyra, A. M. D., Rumi, M. V., & Gentilini, E. R. (2019). First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. *Veterinary and Animal Science*, 7, 100043.
- Stoline, M. R. (1981). The status of multiple comparisons: simultaneous estimation of all pairwise comparisons in one-way ANOVA designs. *The American Statistician*, 35(3), 134-141.
- Strandberg, Y., Gray, C., Vuocolo, T., Donaldson, L., Broadway, M., & Tellam, R. (2005). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine*, 31(1), 72-86.
- Subsecretaría de Lechería de la Nación Argentina. (2012). Estadísticas 2012. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-la_lecheria_argentina__estado_actual_y_su_evolucion.pdf
- Succhil, T., & Jakelin, S. (2014). Evaluación de la Resistencia Bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aisladas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope–EsSalud, Perú. *Revista REBIOLEST*, 2(1): e26.

- Supré, K., De Vliegher, S., Sampimon, O. C., Zadoks, R. N., Vaneechoutte, M., Baele, M., & Haesebrouck, F. (2009). Use of transfer RNA-intergenic spacer PCR combined with capillary electrophoresis to identify coagulase-negative *Staphylococcus* species originating from bovine milk and teat apices. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3204-3210.
- Supré, K., Haesebrouck, F., Zadoks, N., Vaneechoutte, M., piepers, S., & De Vliegher, S. (2011). Some coagulase negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *Journal of Dairy Science*. 94: 2329-2340.
- Sussmann, O., Mattos, L., & Restrepo, A. (2001). Resistencia bacteriana. Hospital Universitario San Ignacio. Unidad de Infectología. Bogotá-Colombia, 43(1), 91.
- Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*, 17(1), 1-14.
- Tamaparu S, McKillip J, Drake M (2001) Development of a polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Journal of Food Protection* 64:664 – 668.
- Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H. D., & Pyörälä, S. (2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative *Staphylococci* identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology*, 115(1), 199-207.
- Taponen, S., Koort, J., Björkroth, J., Saloniemi, H., & Pyörälä, S. (2007). Bovine intramammary infections caused by coagulase- negative *Staphylococci* may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3301-3307.
- Taponen, S. (2008). Bovine mastitis caused by coagulase-negative *Staphylococci*. Tesis Doctoral.
- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134(1), 29-36.

- Taponen, S., Nykäsenoja, S., Pohjanvirta, T., Pitkälä, A., & Pyörälä, S. (2015). Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitic milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1), 12.
- Tenhagen, B. A., Köster, G., Wallmann, J., & Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2542-2551.
- Thorberg BM., Brändström B. (2000) Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase negative *Staphylococci* from bovine mastitis. *Journal of Veterinary Medicine. B.* 2000; 47: 683-691.
- Thorberg, B. M., Danielsson-Tham, M. L., Emanuelson, U., & Waller, K. P. (2009). Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative *Staphylococci*. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4962-4970.
- Timms, L. L., & Schultz, L. H. (1987). Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections¹. *Journal of Dairy Science*, 70(12), 2648-2657.
- Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D. A., & Pier, G. B. (1988). Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of infectious diseases*, 157(4), 713-722.
- Toledo-Arana, A., Merino, N., Vergara-Irigaray, M., Débarbouillé, M., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2005). *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent *biofilm* in the absence of the *arlRS* two-component system. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5318-5329.
- Tomazi, T., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Arcari, M. A., & Dos Santos, M. V. (2015). Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative *Staphylococci* increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3071-3078.
- Tomita, G. M., Nickerson, S. C., Owens, W. E., & Wren, B. (1998). Influence of route

of vaccine administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *Journal of dairy science*, 81(8), 2159-2164.

Tormo, M. A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., & Penadés, J. R. (2005). *Bap*-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, 151(7), 2465–2475.

Tremblay Y. D., Caron V., Blondeau A., Messier S., & Jacques M. (2014); *Biofilm* formation by coagulase-negative *Staphylococci*: Impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Veterinary Microbiology* 172:511–8.

Tremblay, Y. D. N., Lamarche, D., Chever, P., Haine, D., Messier, S., & Jacques, M. (2013). Characterization of the ability of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from the milk of Canadian farms to form *biofilms*. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 234-246.

Tulinski, P., Fluit, A. C., Wagenaar, J. A., Mevius, D., van de Vijver, L., & Duim, B. (2011). Methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococci* on pig farms act as a reservoir of heterogeneous *SCCmec* elements. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2):299-304.

Türkyilmaz, S., & Kaya, O. (2006). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus spp.* isolated from various clinical samples. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(1), 127-132.

Turni, C., Dayao, D., Aduriz, G., Cortabarria, N., Tejero, C., Ibabe, J. C., . & Blackall, P. (2016). A *Pasteurella multocida* strain affecting nulliparous heifers and calves in different ways. *Veterinary microbiology*, 195, 17-21.

Ünal, N., & Çınar, O. D. (2012). Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantón–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical animal health and production*, 44(2), 369-375.

Vadyvaloo, V., & Otto, M. (2005). Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis biofilms* on indwelling medical devices. *The International journal of artificial organs*,

28(11), 1069-1078.

Valle, J., Latasa, C., Gil, C., Toledo-Arana, A., Solano, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2012). *Bap*, a *biofilm* matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002843.

Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2014). Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *Journal of Dairy Science*, 97(9):5275-93.

Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F., & De Vliegher, S. (2015). Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative *Staphylococci* associated with ruminants. *The Veterinary Journal*, 203(1), 44-51.

Vasconcelos, N. G., Pereira, V. C., Júnior, J. A., & da Cunha, M. D. L. (2011). Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 749-762.

Vasudevan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., & Venkitanarayanan, K. S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for *biofilm* formation. *Veterinary Microbiology*, 92(1-2), 179-185.

Vignoli, R., & Seija, V. (2007). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas De Bacteriología Y Virología Médica*, cap, 35, 649-662.

Vimercati, C., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Pisoni, G., Boettcher, P. J., Stella, A., & Moroni, P. (2006). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53(9), 423-428.

Vissio, C., Agüero, D. A., Raspanti, C. G., Odierno, L. M., & Larriestra, A. J. (2015). Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 7-14.

- Von Eiff, C., Heilmann, C., & Peters, G. (1999). New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to *Staphylococci*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(12), 843-846.
- Waller, K. P., Aspán, A., Nyman, A., Persson, Y., & Andersson, U. G. (2011). CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 152(1), 112-116.
- Wang, W., Lin, X., Jiang, T., Peng, Z., Xu, J., Yi, L., Li, F., Fanning, S., and Baloch, Z. (2018) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Frontiers in Microbiology*. 9: 1123.
- Watson, D. L. (1980). Immunological functions of the mammary gland and its secretion-comparative review. *Australian journal of biological sciences*, 33(4), 403-422.
- Watts, J. L., & Owens, W. E. (1987). Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mammary glands. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(11), 2037-2039.
- Watts, J. L., & Owens, W. E. (1989). Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. *Research in Veterinary Science*, 46(1), 1-4.
- Wellenberg, G. J., Van der Poel, W. H. M., & Van Oirschot, J. T. (2002). Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 27-45.
- Wellnitz, O., & Kerr, D. E. (2004). Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 101(3-4), 191-202.
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2012). The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary Journal*, 192(2), 148–52.
- Werling, D., Piercy, J., & Coffey, T. J. (2006). Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-Potential role in pathogen discrimination?. *Veterinary immunology and immunopathology*, 112(1-2), 2-11.
- Wilson, D. J., Mallard, B. A., Burton, J. L., Schukken, Y. H., & Grohn, Y. T. (2009).

Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clinical Vaccine Immunology.*, 16(2), 209-217.

Yang, X., Buonpane, R. A., Moza, B., Rahman, A. N. U., Wang, N., Schlievert, P. M., & Kranz, D. M. (2008). Neutralization of multiple staphylococcal superantigens by a single-chain protein consisting of affinity-matured, variable domain repeats. *The Journal of infectious diseases*, 198(3), 344-348.

Yarwood, J. M., McCormick, J. K., Paustian, M. L., Orwin, P. M., Kapur, V., & Schlievert, P. M. (2002). Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3 implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13138-13147.

Yugueros, J., Temprano, A., Berzal, B., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J. M., & Naharro, G. (2000). Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4351-4355.

Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Luengo, J. M., & Naharro, G. (2001). Identification of *Staphylococcus spp.* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of gap gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3693-3695.

Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Wellenberg, G. J., Gröhn, Y. T., & Schukken, Y. H. (2001). Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84(12), 2649-2663.

Zadoks, R. N., Van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Van Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 3894-3902.

Zecconi, A., Binda, E., Borromeo, V., & Piccinini, R. (2005). Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 203-208.

Zecconi, A., Calvino, L. F., & Fox, L. K. (2006). Intramammary infections. Bulletin of the International Dairy Federation, 408, 1–36.

Zecconi, A., Scali, F., 2013. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. Immunology Letters.150,12–22.

Zhang, S., & Maddox, C. W. (2000). Cytotoxic activity of coagulase- negative *Staphylococci* in bovine mastitis. Infection and Immunity, 68(3), 1102-1108.

Zhao, L., Zhu, B., Jia, Y., Hou, W., & Su, C. (2013). Preparation of biocompatible carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of antibiotic drug. BioMed Research International, 2013(Cmc), 236469.

Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., & Hacker, J. (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infection and immunity, 65(3), 890-896.

Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2010). A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. The New Microbiologica, 33(2), 137.

Zuniga, E., Melville, P. A., Saldenber, A. B., Laes, M. A., Gonsales, F. F., Salaberry, S. R., & Benites, N. R. (2015). Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. Microbial Pathogenesis, 89, 1-6.

ANEXO

Tabla 1: Resultados modelo lineal general y mixto para IgG en suero*Variable dependiente: Dif.IgG***Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
694	-1585,07	-1378,56	838,53	0,08	0,28	0,42

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	623	5,76	0,0167
Grupo	3	35	7,49	0,0005
Grupo:Dia	32	623	4,18	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	623	10,60	0,0012
Grupo	3	35	13,54	<0,0001
Grupo:Dia	32	623	4,18	<0,0001

Efectos fijos

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	0,10	0,03	623	3,70	0,0002
GrupoC	-0,10	0,04	35	-2,58	0,0142
GrupoQ	-0,10	0,04	35	-2,92	0,0060
GrupoV	0,02	0,04	35	0,44	0,6597
GrupoAL:Dia-21	2,1E-04	0,02	623	0,01	0,9903
GrupoC:Dia-21	-0,01	0,02	623	-0,81	0,4162
GrupoQ:Dia-21	0,02	0,01	623	1,25	0,2121
GrupoV:Dia-21	0,01	0,01	623	0,64	0,5218
GrupoAL:Dia-28	-0,07	0,02	623	-2,96	0,0032
GrupoC:Dia-28	-0,03	0,02	623	-1,59	0,1126
GrupoQ:Dia-28	-0,01	0,02	623	-0,60	0,5513
GrupoV:Dia-28	-0,03	0,02	623	-1,83	0,0683
GrupoAL:Dia-35	-0,02	0,03	623	-0,64	0,5232
GrupoC:Dia-35	-0,03	0,02	623	-1,34	0,1808
GrupoQ:Dia-35	-0,01	0,02	623	-0,29	0,7733
GrupoV:Dia-35	-2,6E-03	0,02	623	-0,12	0,9034
GrupoAL:Dia-42	0,02	0,03	623	0,67	0,5020
GrupoC:Dia-42	-0,01	0,03	623	-0,36	0,7154
GrupoQ:Dia-42	-0,08	0,02	623	-4,09	<0,0001
GrupoV:Dia-42	4,5E-03	0,02	623	0,19	0,8480
GrupoAL:Dia 14	-0,05	0,02	623	-2,09	0,0369
GrupoC:Dia 14	0,02	0,03	623	0,49	0,6212
GrupoQ:Dia 14	0,04	0,02	623	1,88	0,0611
GrupoV:Dia 14	-0,03	0,03	623	-1,09	0,2771
GrupoAL:Dia 21	-0,04	0,03	623	-1,37	0,1714
GrupoC:Dia 21	-0,08	0,04	623	-2,18	0,0293
GrupoQ:Dia 21	-0,06	0,03	623	-2,05	0,0406
GrupoV:Dia 21	-0,08	0,04	623	-2,15	0,0321
GrupoAL:Dia 28	-2,9E-03	0,03	623	-0,09	0,9309
GrupoC:Dia 28	-0,12	0,04	623	-2,85	0,0046
GrupoQ:Dia 28	-2,6E-03	0,03	623	-0,09	0,9319
GrupoV:Dia 28	-0,02	0,04	623	-0,50	0,6201
GrupoAL:Dia 56	-4,1E-03	0,04	623	-0,11	0,9104
GrupoC:Dia 56	-0,14	0,05	623	-3,12	0,0019
GrupoQ:Dia 56	-0,03	0,03	623	-0,86	0,3880
GrupoV:Dia 56	-0,07	0,04	623	-1,87	0,0623

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*
 Formula: $\sim 1 | \text{Animal}$

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,05

Estructura de correlación

Modelo de correlación: *Continuous AR(1)*
 Formula: $\sim 1 | \text{Animal}$

Parámetros del modelo

Parámetro	Estim
Phi	0,76

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 \mid \text{Momento} * \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
A*AL	1,00
D*AL	1,48
A*V	0,79
D*V	1,65
A*Q	0,70
D*Q	1,41
A*C	0,91
D*C	1,94

Dif.IgG - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	0,10	0,03	A
AL	0,09	0,02	A
Q	-0,01	0,02	B
C	-0,04	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Dif.IgG - Medias ajustadas y errores estándares para Dia*Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Dia	Grupo	Medias	E.E.	
-21	V	0,13	0,03	A
-42	V	0,12	0,03	A
-42	AL	0,12	0,03	A
-14	V	0,12	0,03	A
-35	V	0,12	0,03	A
-21	AL	0,10	0,03	A
-14	AL	0,10	0,03	A
28	V	0,10	0,04	A
28	AL	0,10	0,04	A
56	AL	0,10	0,04	A
14	V	0,09	0,04	A
-35	AL	0,08	0,03	A
-28	V	0,08	0,03	A
21	AL	0,06	0,04	B
14	AL	0,05	0,04	B
56	V	0,04	0,04	B
14	Q	0,04	0,04	B
21	V	0,04	0,04	B
-28	AL	0,03	0,03	B
14	C	0,02	0,05	B
-21	Q	0,01	0,02	B
-14	C	4,3E-03	0,03	B
-14	Q	-2,0E-03	0,02	B
28	Q	-4,6E-03	0,04	B
-42	C	-0,01	0,03	B
-35	Q	-0,01	0,02	B
-21	C	-0,01	0,03	B
-28	Q	-0,01	0,02	B
-35	C	-0,03	0,03	B
-28	C	-0,03	0,03	B
56	Q	-0,03	0,04	B
21	Q	-0,06	0,04	C
21	C	-0,08	0,05	C
-42	Q	-0,08	0,02	C
28	C	-0,12	0,05	C
56	C	-0,14	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 2: Resultados modelo lineal general y mixto para IgG1 en suero*Variable dependiente: Dif.IgG1***Medidas de ajuste del modelo**

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
694	-1496,95	-1290,45	794,48	0,07	0,15	0,57

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	623	24,81	<0,0001
Grupo	3	35	2,08	0,1210
Grupo:Dia	32	623	2,46	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	623	22,49	<0,0001
Grupo	3	35	1,93	0,1425
Grupo:Dia	32	623	2,46	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios*Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent**Formula: ~1|Animal**Desvíos estándares y correlaciones*

	(const)
(const)	0,09

Estructura de correlación*Modelo de correlación: Continuous AR(1)**Formula: ~ 1 | Animal**Parámetros del modelo*

Parámetro	Estim
Phi	0,55

Estructura de varianzas*Modelo de varianzas: varIdent**Formula: ~ 1 | Momento * Grupo**Parámetros de la función de varianza*

Parámetro	Estim
A*AL	1,00
D*AL	1,12
A*V	0,69
D*V	0,89
A*Q	1,08
D*Q	1,57
A*C	0,90
D*C	2,66

Dif.IgG1 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo*Dia

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Dia	Medias	E.E.	
V	28	0,03	0,03	B
V	21	0,01	0,03	A
Q	-42	-0,01	0,03	A
Q	-28	-0,01	0,03	A
Q	-35	-0,02	0,03	A
C	-42	-0,03	0,03	A
V	-42	-0,04	0,03	A
Q	-21	-0,04	0,03	A
V	-21	-0,04	0,03	A
Q	-14	-0,04	0,03	B
V	-35	-0,04	0,03	A
V	-14	-0,04	0,03	B
V	56	-0,05	0,03	A
C	-35	-0,05	0,03	A
Q	14	-0,05	0,04	A
V	14	-0,05	0,03	A
C	21	-0,06	0,05	A
V	-28	-0,07	0,03	A
C	-28	-0,07	0,03	A
Q	21	-0,08	0,04	A
C	14	-0,08	0,05	A
Q	28	-0,10	0,04	A
Q	56	-0,10	0,04	A
C	-14	-0,11	0,03	A
AL	-42	-0,11	0,03	B
AL	21	-0,11	0,03	A
C	-21	-0,12	0,03	B
AL	-35	-0,12	0,03	B
AL	-21	-0,12	0,03	B
AL	-14	-0,13	0,03	A
AL	56	-0,13	0,03	A
AL	-28	-0,14	0,03	B
AL	14	-0,14	0,03	A
AL	28	-0,14	0,03	A
C	28	-0,18	0,05	A
C	56	-0,22	0,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Dif.IgG1 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	-0,03	0,03	A
Q	-0,05	0,03	A
C	-0,10	0,03	A
AL	-0,13	0,03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Tabla 3: Resultados modelo lineal general y mixto para IgG2 en suero**

Variable dependiente: Dif.IgG2

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
688	-1714,87	-1508,79	903,43	0,04	0,40	0,67

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	617	1,36	0,2446
Grupo	3	35	11,71	<0,0001
Grupo:Dia	32	617	3,60	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	617	0,62	0,4309
Grupo	3	35	11,88	<0,0001
Grupo:Dia	32	617	3,60	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1|Animal

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,05

Estructura de correlación

Modelo de correlación: Continuous AR(1)

Formula: ~ 1 | Animal

Parámetros del modelo

Parámetro	Estim
Phi	0,41

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 \mid \text{Momento} * \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
A*AL	1,00
D*AL	1,53
A*V	1,39
D*V	1,58
A*Q	1,51
D*Q	1,28
A*C	1,33
D*C	1,56

Dif.IgG2 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	0,09	0,02	A
AL	0,03	0,02	B
Q	-0,03	0,02	C
C	-0,05	0,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Dif.IgG2 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo*Dia

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Dia	Medias	E.E.		
V	21	0,13	0,03	A	
V	28	0,12	0,03	A	
V	-14	0,11	0,02	A	
V	-42	0,10	0,02	A	
V	14	0,08	0,02		B
V	-21	0,08	0,02		B
V	56	0,08	0,03		B
V	-35	0,07	0,02		B
AL	-14	0,06	0,02		B
AL	28	0,06	0,02		B
V	-28	0,04	0,02		B
AL	-42	0,04	0,02		B
AL	21	0,04	0,02		B
AL	-21	0,03	0,02		B
AL	56	0,02	0,02		B
AL	14	0,02	0,02		B
AL	-35	0,01	0,02		B
C	14	4,5E-04	0,02		C
Q	-28	-0,01	0,02		C
Q	-14	-0,01	0,02		C
Q	-21	-0,01	0,02		C
Q	-42	-0,02	0,02		C
Q	21	-0,02	0,02		C
AL	-28	-0,02	0,02		C
C	-42	-0,02	0,02		C
Q	14	-0,02	0,02		C
Q	-35	-0,03	0,02		C
C	-14	-0,03	0,02		C
C	-21	-0,04	0,02		C
C	-35	-0,04	0,02		C
C	21	-0,06	0,02		C
Q	56	-0,06	0,02		C
C	28	-0,07	0,02		C
Q	28	-0,07	0,02		C
C	-28	-0,09	0,02		C
C	56	-0,11	0,02		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**Tabla 4: Resultado de modelo lineal general y mixto para IgG en calostro**

Variable dependiente: Calostro.IgG

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
70	-66,93	-49,41	41,46	0,15	0,56	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1829,51	<0,0001
Grupo	3	31,03	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3895,98	<0,0001
Grupo	3	31,03	<0,0001

Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Grupo	3	66	31,03	<0,0001

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 \mid \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
AL	1,00
V	1,45
C	0,39
Q	0,77

Calostro.IgG - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
AL	0,94	0,03	A
V	0,86	0,06	A
C	0,72	0,01	B
Q	0,56	0,03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 5: Resultado de modelo lineal general y mixto para IgG1 en calostro

variable dependiente: *Calostro.IgG1*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
70	31,11	48,63	-7,56	0,45	0,88	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1544,89	<0,0001
Grupo	3	148,55	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2200,39	<0,0001
Grupo	3	148,55	<0,0001

Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Grupo	3	66	148,55	<0,0001

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 \mid \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
AL	1,00
V	1,04
C	0,21
Q	0,44

Calostro.IgG1 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	2,51	0,12	A
AL	2,48	0,10	A
C	0,87	0,02	B
Q	0,67	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 6: Resultado de modelo lineal general y mixto para IgG2 en calostro

Variable dependiente: *Calostro.IgG2*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
70	-23,54	-6,03	19,77	0,29	0,57	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	343,88	<0,0001
Grupo	3	31,98	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1110,98	<0,0001
Grupo	3	31,98	<0,0001

Pruebas de hipótesis tipo III - prueba

	Source	numDF	denDF	F-value	p-value
1	Grupo	3	66	31,98	<0,0001

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 \mid \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
AL	1,00
V	1,60
C	0,21
Q	0,34

Calostro.IgG2 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	1,03	0,12	A
AL	0,89	0,07	A
C	0,42	0,02	B
Q	0,32	0,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 7: Resultado de modelo lineal general y mixto para IgG en Leche

Variable dependiente: *Leche.IgGt*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
268	-387,09	-309,45	215,55	0,20	0,38	0,80

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	221	134,34	<0,0001
Grupo	3	31	6,41	0,0017
Grupo:Dia	12	221	13,15	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	221	126,50	<0,0001
Grupo	3	31	6,76	0,0012
Grupo:Dia	12	221	13,15	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*
 Formula: $\sim 1 | \text{Animal}$

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,15

Estructura de correlación

Modelo de correlación: *Continuous AR(1)*
 Formula: $\sim 1 | \text{Animal}$

Parámetros del modelo

Parámetro	Estim
Phi	0,47

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*
 Formula: $\sim 1 | \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
AL	1,00
V	0,52
Q	0,27
C	0,32

Leche.IgGt - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	0,50	0,06	A
AL	0,42	0,06	A
C	0,29	0,05	B
Q	0,17	0,05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Leche.IgGt - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo*Dia

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Dia	Medias	E.E.	
V	14	0,61	0,06	A
AL	14	0,61	0,07	A
V	21	0,53	0,06	A
V	28	0,48	0,06	B
AL	21	0,40	0,07	B

C	14	0,34	0,06	B
AL	28	0,32	0,07	C
C	21	0,29	0,06	C
C	28	0,28	0,06	C
V	56	0,26	0,07	C
Q	14	0,21	0,05	C
C	56	0,19	0,06	C
AL	56	0,18	0,08	C
Q	21	0,17	0,05	C
Q	56	0,13	0,05	C
Q	28	0,11	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 8 : Resultado de modelo lineal general y mixto para IgG1 en Leche

Variable dependiente: *Leche.IgG1*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
268	-8,10	69,55	26,05	0,29	0,44	0,89

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	221	120,00	<0,0001
Grupo	3	31	7,16	0,0009
Grupo:Dia	12	221	11,08	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	221	112,43	<0,0001
Grupo	3	31	6,82	0,0012
Grupo:Dia	12	221	11,08	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*
 Formula: *~1|Animal*

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,37

Estructura de correlación

Modelo de correlación: *Continuous AR(1)*
 Formula: *~ 1 | Animal*

Parámetros del modelo

Parámetro	Estim
Phi	0,69

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*

Formula: $\sim 1 \mid \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
AL	1,00
V	0,89
Q	0,94
C	0,54

Leche.IgG1 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	1,23	0,15	A
AL	0,97	0,13	A
C	0,49	0,13	B
Q	0,43	0,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Leche.IgG1 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo*Dia

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Dia	Medias	E.E.	
V	21	1,38	0,16	A
V	14	1,34	0,16	A
V	28	1,33	0,16	A
AL	14	1,14	0,14	A
AL	21	1,09	0,14	A
AL	28	1,03	0,14	A
V	56	0,75	0,17	B
Q	14	0,55	0,14	B
C	14	0,54	0,14	B
C	21	0,52	0,14	B
C	28	0,49	0,14	B
AL	56	0,46	0,15	B
Q	21	0,46	0,14	B
C	56	0,37	0,14	B
Q	56	0,33	0,14	B
Q	28	0,27	0,14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 9: Resultado de modelo lineal general y mixto para IgG2 en Leche

Variable dependiente: *Leche.IgG2*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
268	-302,38	-224,74	173,19	0,15	0,41	0,69

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	221	91,15	<0,0001
Grupo	3	31	9,08	0,0002
Grupo:Dia	12	221	6,10	<0,0001

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	221	85,24	<0,0001
Grupo	3	31	10,07	0,0001
Grupo:Dia	12	221	6,10	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: *pdIdent*
 Formula: $\sim 1 | \text{Animal}$

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,10

Estructura de correlación

Modelo de correlación: *Continuous AR(1)*
 Formula: $\sim 1 | \text{Animal}$

Parámetros del modelo

Parámetro	Estim
Phi	0,25

Estructura de varianzas

Modelo de varianzas: *varIdent*
 Formula: $\sim 1 | \text{Grupo}$

Parámetros de la función de varianza

Parámetro	Estim
AL	1,00
V	0,95
Q	0,29
C	1,08

Leche.IgG2 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Medias	E.E.	
V	0,37	0,04	A
AL	0,26	0,04	A
C	0,12	0,04	B
Q	0,07	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Leche.IgG2 - Medias ajustadas y errores estándares para Grupo*Dia

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Grupo	Dia	Medias	E.E.		
V	14	0,57	0,06	A	
AL	14	0,34	0,05		B
V	21	0,33	0,06		B
AL	21	0,27	0,05		B
AL	28	0,27	0,05		B
V	28	0,24	0,06		B
V	56	0,16	0,06		C
C	14	0,15	0,06		C
C	56	0,13	0,06		C
C	21	0,11	0,06		C
AL	56	0,11	0,05		C
Q	56	0,09	0,03		C
C	28	0,08	0,06		C
Q	14	0,07	0,03		C
Q	21	0,06	0,03		C
Q	28	0,06	0,03		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 10: Resultados de modelo lineal general y mixto para RCS

Variable dependiente: RCS.x1000

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1
123	1357,99	1408,77	-659,99	94,96	0,13	0,32

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	76	36,17	<0,0001
Grupo	3	31	1,16	0,3410
Grupo:Dia	12	76	0,82	0,6295

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	76	54,05	<0,0001
Grupo	3	31	1,71	0,1863
Grupo:Dia	12	76	0,82	0,6295

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1|Animal

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	33,26

Estructura de correlación

Modelo de correlación: Continuous AR(1)

Formula: ~ 1 | Animal

Parámetros del modelo

Parámetro	Estim
Phi	0,07.