

## Evaluación del crecimiento bacteriano *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen bovino aisladas de infecciones intramamarias transitorias y persistentes

Sacco, S.C.<sup>1,2</sup>; Lovato, M.<sup>1</sup>; Pereyra, E.A.L.<sup>1</sup>; Baravalle, C.<sup>1</sup>; Calvino, L.F.<sup>3</sup>; Renna, M.S.<sup>1</sup>; Dallard, B.E.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). <sup>2</sup>Patología Veterinaria, Departamento de Preclínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Esperanza, Santa Fe, Argentina. <sup>3</sup>Estación Experimental Agropecuaria Rafaela – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Rafaela, Santa Fe, Argentina. sofiasaccovet@gmail.com

PICT 2014-1324. Asociación entre genotipos bacterianos y persistencia de las infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus* en bovinos. Proyecto financiado por ANPCyT. Directora:

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más frecuentemente aislado de casos de mastitis bovina, tanto en Argentina, como en otros países de gran desarrollo lechero. Esta enfermedad ocasiona importantes pérdidas económicas en términos productivos, de salud animal y por requerimientos de servicios veterinarios; además tiene impacto en salud pública por la progresiva resistencia microbiana debido al uso excesivo de antibióticos. Aunque *S. aureus* puede causar mastitis aguda y clínica con alteración macroscópica de la leche, la forma más frecuente de presentación es la subclínica con tendencia a la cronicidad, sin alteración macroscópica de la leche, pero con recuentos elevados de células somáticas y persistencia de las bacterias en la glándula mamaria (GM). Se ha demostrado que estas diferencias en las formas de presentación dependen principalmente de variaciones entre cepas en términos de virulencia potencial<sup>3</sup>. De hecho, ciertas cepas de *S. aureus* son capaces de inducir de forma reproducible mastitis crónicas leves mientras que otras pueden causar mastitis gangrenosas en rumiantes<sup>1</sup>. Durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase post logarítmica. Se ha propuesto que esta expresión bifásica de los factores de virulencia cumpliría con la función de organizar el proceso de infección<sup>2</sup>.

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes parámetros del crecimiento *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen bovino y determinar asociaciones entre los mismos y la forma de presentación de la infección intramamaria (IIM) (transitoria-T o persistente-P).

Se utilizaron 15 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas: 9 cepas (179, 209, 864AI, 864PI, 806AI, 14AD, 14AI, 350AI y 3AI) provenían de IIM T y 2 cepas (5011 y 037AD) de IIM P. Las cepas aisladas solo una vez durante toda la lactancia fueron consideradas T y aquellas aisladas a partir de 3 muestreos consecutivos cada 21 días durante la lactancia fueron consideradas P. Además, se utilizaron 3 cepas (V329, 4125 y 843) portadoras del gen *bap* (que codifica para la proteína Bap asociada a la producción de biopelícula) y la cepa Neoubould 305 (ATCC 29740). Las cepas conservadas a -80°C en crioviales conteniendo caldo Tripteína Soya –TSC- suplementado con glicerol (15% v/v), se reactivaron mediante siembra en estrías en placas de Agar Base Columbia (Britania), y se incubaron por 24 horas en estufa a 35-37°C. Luego se sembraron en medio líquido, en tubos de vidrio estéril se colocaron 5 ml de TSC a los cuales se les agregó una colonia aislada a partir del cultivo sólido. Las cepas se incubaron durante 16 horas en estufa a 37 °C, con agitación. A partir del cultivo líquido se realizaron diluciones (1:100) en placas de 96 pocillos. Se utilizó como control negativo TSC sin inocular. El crecimiento se determinó mediante lecturas de densidad óptica (DO) medida a 630nm; utilizando el equipo Multi-Mode Microplate Reader, Synergy™ HT Biotek durante 24 horas cada 1 hora. Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el programa SPSS 11.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). La evaluación estadística de los datos de DO obtenidos de las curvas de crecimiento se realizó por ANOVA de medidas repetidas y post test de Duncan. El análisis de los

tiempos de duración de la fase de crecimiento logarítmica (*lagtime*) obtenidos para cada cepa se realizó por ANOVA y post test de Tukey. Se consideraron significativas las diferencias de  $p < 0,05$ .

El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias en las DO obtenidas entre las cepas evaluadas ( $p = 0,021$ ). La cepa Neubould fue la que presentó un mayor desarrollo a lo largo del tiempo, mostrando mayores valores de DO con respecto a las cepas 864AI, 864PI, 14AD, 179, 806AI, 4125, 209, 5011 y 037AD ( $p < 0,05$ ). La cepa 209 fue la que presentó menor desarrollo, mostrando valores de DO menores que los de las cepas Neubould, 3AI y 350AI ( $p < 0,05$ ). La evaluación de la duración de la fase de crecimiento logarítmica mostró diferencias entre las cepas evaluadas ( $p = 0,002$ ). La cepa V329 fue la que presentó la fase de crecimiento logarítmica más prolongada (6 horas) mostrando diferencias ( $p < 0,05$ ) con las cepas 350AI, Neubould, 14AI y 3AI (1,3 horas), con las cepas 5011 y 864PI (2 horas) y con las cepas 806AI, 037AD y 179 (2,3 horas). La duración de la fase de crecimiento logarítmica de las demás cepas evaluadas no mostraron diferencias entre sí ni tampoco con la cepa V329. El *lagtime* para la cepa 209 fue 2,3 horas y mientras que para las cepas 14AD, 864AI, 4125 y 843 fue de 3 horas. Las cepas que mostraron *lagtimes* más prolongados (V329, 4125 y 843) son portadoras del gen *bap* y presentan fuerte capacidad para producir biopelícula, según resultados previos no mostrados en este trabajo. No se observaron asociaciones entre la duración de la fase de crecimiento logarítmica y las DO obtenidas de las curvas de crecimiento de las diferentes cepas con el comportamiento clínico de origen de las mismas (IIM T o P). Se pudo observar, en todos los casos, que el tiempo en el que se alcanzó el máximo crecimiento bacteriano en DO ( $t$  at Max V) fue siempre posterior a la fase logarítmica de crecimiento y osciló para todas las cepas entre las 3 y 4,3 horas, con la única excepción de la cepa V329 que alcanzó la máxima DO a las 9 horas de crecimiento.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que las curvas de crecimiento y la duración de las fases de crecimiento logarítmico difieren ampliamente entre las cepas de *S. aureus* evaluadas y que tales parámetros no se asocian con el comportamiento clínico de origen de las cepas (IIM T o P). Sin embargo, se necesitan futuros estudios con un mayor número de cepas para descartar la ausencia de asociación.

## Bibliografía

- 1-Le Maréchal, C.; Jardin, J.; Jan G.; Even, S.; Pulido, C.; Guibert, J.M.; Hernandez, D.; François, P.; Schrenzel, J.; Demon, D.; Meye, E.; Berkova, N.; Thiéry, R.; Vautor, E.; Le Loir, Y. (2011) Staphylococcus aureus seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. Vet Res. 42:35.
- 2- Lowy, F.D. (1998) Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 339:520-32.
- 3-Zbinden, C.; Stephan, R.; Johler, S.; Borel, N.; Bünter, J.; Bruckmaier, R.M.; Wellnitz, O. (2014) The inflammatory response of primary bovine mammary epithelial cells to Staphylococcus aureus strains is linked to the bacterial phenotype. PLoS One 9,e87374.