

Estudio de la prevalencia de genes de virulencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen bovino aisladas de Santa Fe y Córdoba.

Pereyra, EAL^{1,2}; Matilla, MC²; Calvet, EM²; Molina M²; Dallard, BE^{1,2}; Calvino, LF^{2,3}.

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral)¹. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL)²

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA)³.

epereyra@fcv.unl.edu.ar

La mastitis bovina es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes del ganado vacuno que genera grandes pérdidas económicas a los productores y la industria láctea mundial. Además, afecta la imagen del sector lechero, debido al uso inadecuado de antibióticos y el impacto de sus residuos en la Salud Pública por la potencial emergencia de bacterias resistentes³. Si bien la mastitis es causada por numerosos agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis, tanto en Argentina², como en otros países de gran desarrollo lechero. 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). Este tipo de manifestación es la que causa mayores perjuicios a los productores lecheros debido a su elevada prevalencia y carencia de síntomas evidentes, lo que contribuye a que animales asintomáticos actúen como reservorios de la enfermedad y contribuyan a la rápida propagación de la bacteria dentro del rodeo.

En la última década numerosos genes de virulencia de *S. aureus* (*spa* IgG-binding, *spa* X-región, *nuc*, *clfA*, *clfB*, *coa*, *hla*, *hly*, *fnbA*, *fnbB*, *cap*, *agrI*, *agrII*, *agrIII*, *icaA*, *icaD*, *icaC*, *bap*) han sido descriptos en aislamientos provenientes de mastitis bovina¹. Además, ciertos genes pueden estar asociados con determinantes de resistencia (*mecA*, *bla_Z*) e hipervirulencia. Por otra parte, se ha demostrado que *S. aureus* posee diferentes habilidades para colonizar el tejido y diseminarse dentro de la GM y que estas diferencias son debidas a la expresión de los factores de virulencia los cuales influyen en la difusión en el rodeo.

Estudios epidemiológicos moleculares sobre aislamientos de *S. aureus* bovinos han demostrado que un gran número de tipos están implicados en la etiología de la mastitis en todo el mundo y que ciertos tipos parecen predominar dentro de regiones geográficas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la prevalencia de los principales genes de virulencia relacionados con la patogenicidad de *S. aureus* a partir de aislamientos provenientes de IIM (infecciones intramamarias) subclínicas de origen bovino de diferentes regiones de Santa Fe y Córdoba.

Se colectaron 86 cepas de *S. aureus* desde el año 2006 a 2016 de origen bovino con IIM subclínicas de diferentes tambos ubicados en la provincia de Santa Fe. Específicamente en las ciudades de Esperanza y Rafaela y de tambos de la provincia de Córdoba, ubicados en las ciudades de Río Cuarto, Río Segundo y General San Martín. En tambos de Esperanza y Rafaela se aislaron 18 cepas de cada región. Mientras que 23, 20 y 7 cepas se aislaron en tambos de Río Cuarto, Río Segundo y General San Martín, respectivamente. Las cepas fueron cedidas por laboratorios de diagnóstico y por diferentes instituciones educativas pertenecientes a organismos públicos. Las bacterias fueron almacenadas en glicerol 10% (v/v) a -80°C hasta el momento de la realización de las pruebas moleculares. Posteriormente se procedió a extraer y purificar ADN genómico de todos los aislamientos de *S. aureus*. Se realizó la identificación de especie como *S. aureus* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers que amplificaron un fragmento del gen Sa422 de 108 pares de bases (pb).

Se realizó PCR convencional para la evaluación de la prevalencia de genes que codifican para la expresión de proteínas de adherencia, internalización y formación de biofilm, se utilizaron los

siguientes genes *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *icaA*, *icaD*, *icaC* y el gen *bap*. Para la caracterización de la región variable X y región de unión a IgG de *spa*. Para los grupos *agr* fueron determinados mediante PCR multiplex utilizando primers para los cuatro grupos *agr* (I, II, III y IV). Se utilizó la metodología empleada previamente en el laboratorio⁴.

Cabe mencionar que en Argentina existen escasos estudios que aporten datos sobre prevalencia de genes relacionados con la adherencia y formación de biofilm, en cepas de *S. aureus* procedentes de IIM subclínicas en bovinos.

Los resultados de prevalencia que se obtuvieron de los genes que codifican para la expresión de proteínas de adherencia e internalización: *clfA*, *clfB*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, fueron elevadas en todas las regiones evaluadas, entre un 90% y 100%, estos resultados coinciden con trabajos realizados en varias regiones de Argentina.

En general en nuestros ensayos, el locus *ica* mostró prevalencia elevada y uniforme; observándose para *icaADC* 100%, mientras el 100% resultó *bap* negativa, coincidiendo con la bibliografía encontrada.

Existe una gran variedad de factores bacterianos que han sido asociados con la persistencia intracelular incluyendo a reguladores globales como el sistema Agr. Lo que se pudo observar hasta el momento, que la mayoría de las cepas de origen subclínica presentan el gen *agrI*, encontrándose solo en tres cepas *agrII* positivos y no se detectaron cepas *agrIII* o *agrIV* en todos los aislados. Estos datos coinciden con otros trabajos publicados

Con respecto a la prevalencia de los genes que codifican para la región variable X y región de unión a IgG de *spa* fueron elevados los porcentajes de prevalencia evaluados.

A partir de los resultados obtenidos se demostró que en todas las cepas estudiadas, independientemente del área geográfica, presentaron una alta prevalencia de los factores de virulencia más relevantes. Estos datos aportan información regional para el futuro diseño de inmunógenos multicomponentes dirigidos a prevenir las IIM por *S. aureus*.

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

2-Calvinho, LF.; 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. *Revista FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 4, 29-40.

3-De Vliegher, S.; Fox, LK.; Piepers, S.; McDougall S.; Barkema HW. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J Dairy Sci.*, 95, 1025-1040.

4- Pereyra, EAL.; Picech, F.; Renna, MS.; Baravalle, C.; Andreotti, CS.; Calvinho, LF.; Diez, C.; Dallard, BE. (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.*, 183, 69-77.