

AREA TEMATICA: **SALUD ANIMAL**

**Cambios histopatológicos y persistencia en glándula mamaria murina de dos cepas de *Staphylococcus aureus* con características genéticas diferenciales**

Pereyra EAL<sup>1,2</sup>, Sacco SC<sup>1,2</sup>, Beccaría C<sup>1,2</sup>, Pastor RP<sup>1</sup>, Godoy EC<sup>1</sup>, Sbodio Omar<sup>1</sup>,Calvinho LF<sup>1,3</sup>,  
Dallard BE<sup>1,2</sup>

[elizabeth\\_rfra@hotmail.com](mailto:elizabeth_rfra@hotmail.com)

Facultad de Ciencias Veterinarias<sup>1</sup>. Universidad Nacional del Litoral. Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral)<sup>2</sup>. UNL-CONICET. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA)<sup>3</sup>

Trabajo enmarcado en el Proyecto PICT 2010 (2011-2014), Cód. 0872, denominado: “Mecanismos inmunológicos que intervienen en la infección de la glándula mamaria bovina por *Staphylococcus aureus*”. Proyecto financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica según Resolución N° 98/11. Directora: MV Bibiana Dallard.

El objetivo del trabajo fue caracterizar los cambios histopatológicos y la persistencia en la glándula mamaria (GM) de dos cepas de *Staphylococcus aureus* con características genéticas diferenciales aisladas a partir de leche de bovinos con mastitis clínica y subclínica luego de la inoculación intramamaria en ratón. La cepa A, aislada a partir de leche de animal con infección intramamaria (IIM) clínica, procedente de un tambo con alta prevalencia de *S. aureus* (62 %) y recuento de células somáticas (RCS) promedio de 591.000 cél/ml, altamente difundida en el rodeo, resistente a la penicilina *in vitro*, con alta capacidad de internalización a las células epiteliales mamarias (CEM) ( $7,45 \pm 0,72$  %), presencia del gen *cap8* y sobreexpresión *in vitro* de los genes *ClfA*, *IcaA*, *IcaD* y *FnbB*. La cepa B, aislada a partir de leche de un animal con IIM subclínica (crónica) con alta adaptación a la GM bovina, estimada por su persistencia durante toda la lactancia en el mismo cuarto mamario, procedente de un tambo con baja prevalencia de *S. aureus* (1-3 %) y RCS promedio de 400.000 cél/ml, sensible *in vitro* a la penicilina, con baja capacidad de internalización a las CEM *in vitro* ( $2,142 \pm 0,46$  %), presencia del gen *cap5* y sobreexpresión *in vitro* *FnbA* e *icaD*. Las cepas A y B difieren genéticamente presentando un porcentaje de similitud <20% (evaluado por electroforesis de campos pulsantes). Se utilizaron ratones de la cepa BALBcJ en lactancia. Siete a diez días después del parto, se conformaron tres grupos de ratones que fueron inoculados en las GM abdominales derechas (R4) e izquierdas (L4) con 100 µl de una suspensión de la cepa A de *S. aureus* (grupo 1), con 100 µl de una suspensión de la cepa y B de *S. aureus* (grupo 2) y con 100 µl de solución fisiológica estéril (grupo 3, control). La dosis de inoculación en los grupos 1 y 2 fue de  $1 \times 10^6$  UFC/GM. La inoculación se realizó por vía IM a través del canal del pezón utilizando una aguja 30G X 1/2<sup>3</sup>. Los grupos de hembras en lactancia fueron sacrificados al día 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 11 post inoculación (pi). Las glándulas mamarias L4 y R4 fueron asépticamente diseccionadas y removidas. Una porción del tejido mamario extraído fue homogeneizado en 2 ml de PBS 10x pH 7,2, para posteriormente evaluar el nivel de infección bacteriana. Otra porción del tejido fue fijada en formol bufferado al 4% para exámenes histológicos. Para evaluar la persistencia *in vivo* de las cepas A y B de *S. aureus* seleccionadas, luego de la inoculación IM, se obtuvieron las curvas de crecimiento bacteriano desde el día 1 hasta el día 11 pi<sup>4</sup>. El número de UFC/glándula se incrementó durante las primeras 24-48 hs tanto para la cepa A como para la B, para disminuir en forma gradual hasta el día 5 pi. A partir del día 7 pi, la cantidad de UFC/glándula recuperadas se incrementó notablemente para la cepa B y continuó elevada hasta el día 11 pi, no así para la cepa A que mostró un mayor *clearence* con un menor número de UFC/glándula recuperadas. Se evaluaron los efectos individuales del tiempo de muestreo, de las cepas de *S. aureus* inoculadas y de la interacción entre ambos factores sobre el número de UFC/glándula recuperadas luego de la inoculación IM. Los resultados mostraron un efecto

## AREA TEMATICA: SALUD ANIMAL

significativo del tiempo de muestreo ( $p < 0,001$ ) y de la interacción de ambos factores ( $p < 0,001$ ); en cambio, el efecto de la cepa infectante sobre el número de bacterias recuperadas no fue significativo pero mostró una tendencia ( $p = 0,055$ ). Al día 2 pi el número de UFC/glándula recuperadas de la cepa A fue significativamente mayor al observado para la cepa B ( $p < 0,05$ ). Si bien la tasa de *clearance* bacteriano fue similar entre ambas cepas desde el día 3 al día 9 pi, al día 11 se observó un aumento significativo en el número de UFC/ glándula en el grupo de ratones tratados con la cepa B con respecto al grupo tratado con la cepa A ( $p < 0,05$ ). Si bien ambas cepas lograron persistir hasta el día 11 luego de la infección IM, la cepa A logró un mayor *clearance* a lo largo del tiempo de muestreo, no así la cepa B que incrementó notablemente su número a partir del día 9 y hasta el día 11 pi. No se recuperaron bacterias de las GM de ratones controles, inoculados con solución fisiológica estéril, en ninguno de los tiempos evaluados. Con respecto al daño tisular y reacción inflamatoria luego de la inoculación IM<sup>1,2</sup>, con la cepa A, desde el día 1 hasta el día 3 pi las lesiones observadas fueron: áreas extensas de tejido mamario dañado con hiperemia, presencia de abundante exudado de neutrófilos, macrófagos y células epiteliales descamadas en las luces de conductos y alvéolos, focos de necrosis con pérdida de la estructura alveolar y leve proliferación de tejido conjuntivo (TC). Se observó también infiltrado leucocitario mixto difuso en el TC interalveolar. Al día 5 pi, se observaron zonas de parénquima normal y otras áreas con abundante infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario perialveolar, leve hiperplasia epitelial de conductos, gran cantidad de macrófagos, fibroblastos, fibras colágenas, presencia de focos con neutrófilos y proliferación del TC circunscribiendo las lesiones. Al día 7 y 11 pi se observaron áreas focales extensas con pérdida de la arquitectura normal y reemplazo del parénquima mamario por TC denso con escaso infiltrado de linfocitos. Con la cepa B, desde el día 1 hasta el día 4 pi, se observaron diferentes grados de lesión del tejido mamario. En zonas definidas del parénquima se observaron conductos y alvéolos con abundante exudado de neutrófilos y macrófagos en sus lúmenes, con conservación de la estructura epitelial. En otras zonas, se observó exudado con abundantes neutrófilos y alteración de la estructura alveolar con paredes irregulares, células epiteliales desprendidas en los lúmenes y macrófagos con citoplasmas de aspecto vacuolado. En el TC se observó hiperemia, infiltrado de macrófagos, linfocitos, eosinófilos. A partir del día 5 y hasta el día 11 pi coexistieron en el mismo corte áreas de parénquima con alvéolos activos secretores y conductos con estructura conservada, y áreas focalizadas de alvéolos afuncionales con luces irregulares, y en sectores pérdida de la arquitectura con infiltración de linfocitos, fibroblastos y abundante TC circunscribiendo las lesiones y focos de alvéolos con exudado de neutrófilos en sus lúmenes. Se puede concluir que la cepa A indujo un daño más severo y extenso que la B en el tejido mamario murino, desencadenando un proceso inflamatorio agudo. Mientras que la cepa B indujo un proceso inflamatorio crónico con áreas de daño focalizadas; reflejando ambas cepas el comportamiento clínico observado en bovinos. Los resultados revelan que las características diferenciales moleculares de las cepas de *S. aureus* determinarían los cambios morfológicos y la severidad del proceso inflamatorio observado en la GM murina; asimismo, estas características diferenciales estarían relacionadas con la persistencia de *S. aureus* en la GM en las IIM crónicas.

## Bibliografía

1. Chandler, R.L. (1970) Experimental bacterial mastitis in the mouse. J Med Microbiol. 3:273-282.
2. Boulanger, D.; Brouillette, E.; Jaspar, F.; Malouin, F.; Mainil, J.; Bureau, F.; Lekeux, P. (2007) Helenalin reduces *Staphylococcus aureus* infection *in vitro* and *in vivo*. Vet Microbiol. 119:330-338.
3. Brouillette, E.; Malouin, F. (2005) The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. Microbes Infect. 7:560-568.
4. Tuscherr, L.P.; Buzzola, F.R.; Alvarez, L.P.; Lee, J.C.; Sordelli, D.O. (2008) Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. Infect Immun. 76:5738-5744.