



ACTUALIZACIÓN

Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos

Cecilia M. Camussone^{a,b} y Luis F. Calvinho^{a,*}

^aInstituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Rafaela, Santa Fe, Argentina

^bConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 1 de febrero de 2013; aceptado el 5 de abril de 2013

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus;
Factor de virulencia;
Inmunógeno

Resumen

Staphylococcus aureus es el microorganismo causante de mastitis bovina más prevalente en Argentina y en el mundo. La falta de efectividad frente a este organismo de los métodos tradicionales de control, basados en la higiene y la terapia antibiótica, ha conducido a la búsqueda de alternativas para prevenir la enfermedad. Una de ellas es la manipulación de los mecanismos defensivos del huésped mediante vacunación. La identificación de los factores de virulencia que estimulan las defensas del huésped es fundamental para el desarrollo racional de inmunógenos. *S. aureus* posee múltiples factores de virulencia que interactúan con el huésped en distintas etapas de la infección mamaria; algunos de ellos han mostrado capacidad de generar una respuesta inmune benéfica para el huésped. El objetivo de este artículo es revisar conceptos de estructura, función y utilización como inmunógenos de los factores de virulencia de *S. aureus* considerados como más relevantes en las principales etapas de la infección intramamaria.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Staphylococcus aureus;
Virulence factor;
Immunogen

Virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infections in cows: Relevance and role as immunogens

Abstract

Staphylococcus aureus is the most prevalent mastitis pathogen in Argentina and worldwide. Lack of effectiveness of traditional control measures based on milking hygiene and antibiotic therapy against this organism has led to the development of alternatives

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: calvinho.luis@nta.gob.ar (L.F. Calvinho).

directed to prevent the disease. Among them, the manipulation of host immune mechanisms through vaccination has been explored. The identification of virulence factors able to stimulate host immune defenses is key to developing a rational vaccine. *S. aureus* has multiple virulence factors that interact with the host at different stages of an intramammary infection. The use of some of these factors as immunogens has been shown to elicit protective responses in the host. The structure, function, and use as immunogens of *S. aureus* virulence factors considered to be relevant at different stages of intramammary infections caused by this organism are reviewed in this article.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Staphylococcus aureus es el organismo más frecuentemente aislado de casos de mastitis bovina en Argentina así como en otros países de gran desarrollo lechero⁹⁹. Las particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y curativas tradicionales¹⁰⁰, lo cual tiende a producir infecciones crónicas que, en muchos casos, ocasionan daños permanentes al tejido mamario. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas «no antibióticas» para coadyuvar al control de esta enfermedad. Una de estas alternativas es la manipulación de los mecanismos de defensa específicos del hospedador a través del uso de inmunógenos. En este contexto, es fundamental la identificación de los factores de virulencia que estimulan las defensas humorales y celulares específicas para el control de la enfermedad⁴⁵.

Staphylococcus aureus se caracteriza por presentar múltiples factores de virulencia, algunos de los cuales estarían relacionados con la gravedad de la infección intramamaria (IIM) desarrollada en el huésped²⁰. La expresión de los genes que codifican los factores de virulencia de *S. aureus* está controlada por una red compleja de factores de regulación transcripcional⁷⁰. 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 poslogarítmica. Se ha propuesto que esta expresión bifásica de los factores de virulencia cumpliría con la función de organizar el proceso de infección⁵⁰. Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del huésped facilitando la colonización, lo cual sería seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas (α , β , γ y δ hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (serín proteasas, cisteína proteasas, lipasas)⁸¹. Sin embargo, se ha postulado que, para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, para lo cual regularía negativamente la expresión de factores de virulencia⁸⁴. Esta fina red regulatoria sería la clave en la patogénesis de la infección por *S. aureus* que conduce a la cronicidad de la enfermedad y que, al mismo tiempo, permite la adaptación del microorganismo a los cambios del microambiente durante el curso de la infección y a su supervivencia y persistencia intracelular⁸⁴.

A continuación se revisan conceptos sobre la estructura, función y utilización como inmunógenos de los factores de virulencia de *S. aureus* considerados como más relevantes en las principales etapas de la IIM.

Polisacáridos capsulares

Staphylococcus aureus produce polisacáridos capsulares (capsular polysaccharides [CPs]) *in vitro* en condiciones definidas de cultivo⁹⁰, los cuales también han sido detectados *in vivo* durante IIM experimentales agudas y crónicas³⁶. Se ha demostrado que los CPs confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) bovinos⁹⁰, y esta es considerada la principal línea de defensa de la glándula mamaria frente a patógenos invasores⁷⁴. Los anticuerpos dirigidos contra los CPs tienen un efecto protector, ya que son capaces de opsonizar cepas capsuladas de *S. aureus* y favorecer así la fagocitosis por PMN⁹⁰. La relevancia de los CPs como candidatos para la generación de respuestas protectoras ha sido resaltada en los últimos años en varios estudios^{23,31,32,93}. Además, debe considerarse que una de las vacunas comerciales disponibles actualmente para el control de mastitis por *S. aureus* contiene cepas capsuladas de 2 serotipos de CPs y un polisacárido de superficie, presentes en aislamientos bovinos obtenidos en EE. UU.⁵¹. Sin embargo, el efecto protector de los anticuerpos dirigidos contra esos componentes se encuentra relacionado con la prevalencia y distribución de los tipos de CPs en los aislamientos presentes en cada región geográfica. Se ha propuesto la existencia de 11 serotipos de CPs aislados de infecciones en humanos; sin embargo, solamente se han aislado y caracterizado químicamente 4 de ellos (1,2,5,8), y no existe evidencia suficiente para concluir que los restantes sean cápsulas o estructuras químicamente diferentes de los anteriores⁷². Posteriormente, se describió la presencia de otro tipo capsular, el 336, en *S. aureus* aislados de mastitis bovinas³¹; no obstante, su estructura química no ha sido caracterizada y se ha demostrado recientemente que aislamientos que expresan el polisacárido de superficie 336 poseen los genes *cap5* o *cap8*⁹⁷. Los polisacáridos capsulares 1 y 2 son de hallazgo infrecuente, mientras que los serotipos CP5 y CP8 han sido aislados de infecciones humanas y bovinas a nivel mundial⁷². Ambos serotipos están compuestos por los mismos tres azúcares (ManNAcA, 1-FucNAc y d-FucNAc), y comparten 12 de los 16 genes involucrados en su expresión⁸⁴. Esto ocurre *in vitro*

principalmente durante la fase de crecimiento posexponencial y está influenciada por diversas señales ambientales, como la concentración de sales y el pH⁴⁹.

Los aislamientos de *S. aureus* de rumiantes muestran cierta variabilidad respecto de la distribución de los CPs. En un estudio en el que se evaluaron 273 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas de cuatro importantes cuencas lecheras de EE. UU., el 59 % resultó no tipificable (NT), mientras que el 18 y el 23 % presentaban serotipos 5 y 8, respectivamente²⁹. Un estudio posterior que incluyó 636 aislamientos de Suecia, Islandia, Irlanda, Dinamarca, Finlandia y EE. UU. determinó que, si bien existían diferencias entre países, la mayoría de las cepas europeas (63 %) eran tipificables con antiseros contra los tipos CP5 o CP8, mientras que estos tipos capsulares se encontraron solo en un 42 % de los organismos de EE. UU.⁹², lo que concuerda con hallazgos previos comunicados por Guidry *et al.*²⁹.

Un estudio realizado en Argentina determinó que solo el 14 % de 195 aislamientos de leche bovina fueron caracterizados como serotipos CP5 o CP8⁸⁸. Sin embargo, más del 70 % de los aislamientos pertenecía a la misma provincia, mientras que solamente el 4,6 % provenía de las dos provincias que concentran aproximadamente el 60 % de la producción lechera del país. En un estudio posterior que incluyó 15 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en distintos rodeos lecheros de la provincia de Buenos Aires, 7 fueron caracterizadas genotípicamente como tipo CP5, mientras que ninguna como tipo CP8⁸². En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio se evaluó por PCR la presencia de los loci capsulares *cap5* y *cap8* en 157 *S. aureus* aislados de mastitis clínicas y subclínicas registradas en las provincias de Santa Fe (n = 91), Buenos Aires (n = 31), Córdoba (n = 22) y Entre Ríos (n = 13). El 64 % de los aislamientos pudo genotipificarse; el 53 % resultó CP5 y el 11 % CP8. Además, al evaluar fenotípicamente la presencia de CPs, se observó que el 50 % de los aislamientos con genotipo *cap5* o *cap8* eran capaces de producirlo *in vitro*⁹. La caracterización genotípica es altamente significativa debido a que varios factores involucrados en la expresión de cápsula no han sido del todo definidos, y su expresión *in vivo* no se correlaciona necesariamente con la expresión *in vitro*⁷². En consecuencia, los resultados obtenidos en los estudios de genotipificación remarcan la importancia de la incorporación de cepas productoras de CPs a vacunas destinadas al control de IIM por *S. aureus* prevalentes en nuestra región.

Las propiedades antifagocíticas de los CPs determinaron que, desde épocas tempranas, fueran blancos de interés en el diseño de vacunas contra mastitis estafilocócicas. La inmunización de vacas con una vacuna experimental compuesta por una cepa capsulada de *S. aureus* y toxoides, formulada con un adyuvante oleoso, estimuló respuestas significativas de IgG₁, IgG₂, IgA e IgM en leche y resultó eficaz en reducir el número de IIM desarrolladas luego de un desafío experimental⁶⁶.

En Argentina, un inmunógeno multivalente compuesto por una cepa capsulada de *S. aureus*, extracto crudo de exopolisacáridos de *S. aureus* y cepas no capsuladas de *S. aureus*, *S. uberis* y *S. agalactiae*, formulado con Al(OH)₃, confirió protección contra mastitis clínicas y subclínicas por *S. aureus*⁸⁴. Sin embargo, el tipo capsular producido por la cepa de *S. aureus* utilizada en dicho estudio no fue defini-

do. Asimismo, la utilización de CPs conjugados con proteínas en inmunógenos experimentales^{23,93} ha generado la producción de anticuerpos de tipo IgG₁ e IgG₂, reconocidos por su actividad opsonofagocítica. Sin embargo, la inmunización de animales con una cepa de *S. aureus* CP5 generó niveles de anticuerpos específicos contra CP5 significativamente superiores a los detectados en animales inmunizados con CP5 conjugado a albúmina sérica humana⁹³.

En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo, la inmunización de vaquillonas preñadas con una bacterina CP5 de *S. aureus* formulada con ISCOMATRIX™ (ISCOMs) estimuló niveles superiores de IgG anti-*S. aureus* en sangre y leche, e IgG anti-CP5 en sangre, en comparación con el mismo inmunógeno formulado con Al(OH)₃. Además, se observó un incremento significativo en los niveles de IgG₂ sanguíneos, lo cual aumentó la capacidad de opsonización y fagocitosis por PMN bovinos *in vitro*¹⁰.

Biofilm

Algunas cepas de *S. aureus* son capaces de producir *biofilm*, el cual consiste en comunidades de células bacterianas adheridas a un sustrato, a una interfase o entre sí, contenidas en una matriz polimérica extracelular. Estas células exhiben un fenotipo alterado en cuanto a su crecimiento, expresión génica y producción de proteínas¹⁷. La fase inicial del mecanismo de formación de *biofilm* involucra dos etapas: la primera comprende la unión de las células a la superficie, lo cual es facilitado por adhesinas asociadas a la pared celular. La segunda etapa se caracteriza por la multiplicación celular y la formación de una estructura madura compuesta por muchas capas de células, conectadas entre sí por polisacáridos extracelulares⁵⁹. Finalmente, en el proceso de maduración se genera una capa de *slime* que protege el *biofilm* bacteriano. Uno de los principales constituyentes de la matriz del *biofilm* es el polisacárido de superficie poli-N-acetil β-1,6 glucosamina (PNAG), sintetizado por proteínas codificadas por el operón de adhesión intercelular *ica*⁵². Otros componentes como los ácidos teicoicos, las proteínas bacterianas, entre ellas la proteína estafilocócica de superficie (*staphylococcal surface protein-1* [SSP-1]), el *clumping factor A*, las proteínas asociadas a *biofilm* (*biofilm-associated proteins* [BAP]) y el ADN extracelular contribuyen también a la estructura de los *biofilms*²⁷.

El crecimiento de un *biofilm* bacteriano está limitado por la disponibilidad de paso de los nutrientes para las bacterias a través del *biofilm*⁸⁹, así como por factores ambientales como el pH, la perfusión de oxígeno, las fuentes de carbono y la osmolaridad¹⁸. Cuando el *biofilm* alcanza una masa crítica, llega a un equilibrio dinámico en el cual las capas más externas se escapan de aquel y colonizan otras superficies¹⁸. Esta conformación de *biofilm* adoptada por los microorganismos les otorga ventajas, en comparación con sus contrapartes planctónicas. Estudios realizados *in vitro* con líneas celulares mamarias demostraron que existe una interacción específica entre las bacterias recubiertas de *slime* y las células epiteliales, la cual sería un paso fundamental en la colonización de la glándula mamaria². Sin embargo, en un estudio reciente, se observó que la habilidad de producir *biofilm* en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis

no influyó la capacidad de invasión a células epiteliales mamarias⁷¹ (*mammalian epithelial cells* [MAC-T]).

Diversos estudios han evaluado también la relación entre la habilidad de producción de *biofilm* en cepas de *S. aureus* productoras de mastitis bovina y su sensibilidad a los antibióticos⁵⁹. Se ha observado que las bacterias cultivadas *in vitro* en condiciones que favorecen la producción de *biofilm* son más resistentes al tratamiento con agentes antimicrobianos, comparadas con aquellas crecidas en condiciones planctónicas³. Además, las condiciones en las cuales los *biofilms* son producidos, como por ejemplo la composición de los medios en los cuales los microorganismos son cultivados, también ejercen un efecto final en su viabilidad y en la resistencia a los antibióticos³.

Numerosos estudios realizados en diferentes partes del mundo han investigado la capacidad de producción de *biofilm* en cepas de *S. aureus* causantes de mastitis bovina. La evaluación genotípica de 35 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM en EE. UU. mostró que todos los aislamientos resultaron positivos para la amplificación del locus *ica*, y el 68 % de estos produjeron *biofilm in vitro*⁶⁶. En un estudio posterior realizado con 221 cepas de *S. aureus*, el 41 % de los aislamientos obtenidos de muestras de leche bovina resultaron positivos para la producción de *biofilm in vitro*, en comparación con el 24,7 y el 14,7 % de los obtenidos de piel del pezón y de la máquina de ordeñar, respectivamente²². Basados en estos resultados, los autores sugirieron que la producción de *biofilm* sería un factor de riesgo en la infección por este organismo.

En un estudio en el que se evaluaron 59 cepas de *S. aureus* obtenidas de secreciones de glándulas mamarias en Polonia, el 54,2 % produjeron *slime in vitro*⁶⁷. En un estudio reciente realizado en ese mismo país, el 100 % de los *S. aureus* aislados de mastitis bovina presentaron los genes *icaA* e *icaD*, aunque solo el 57,6 % de ellos produjo *biofilm* tras la evaluación por métodos fenotípicos⁹¹. En contraste, al evaluar 102 *S. aureus* aislados de mastitis subclínicas en India, de 49 y 37 cepas que resultaron positivas por dos métodos fenotípicos diferentes solo el 61 y el 59 % de ellas, respectivamente, presentaron los genes *icaA* e *icaD*⁵.

Por otro lado, la evaluación de 50 cepas de *S. aureus* obtenidas de leches mastíticas en Brasil mostró que el 80 % de ellas eran capaces de producir *slime in vitro*, aunque solo un 12 y un 14 % presentó los genes *icaA* e *icaD*, respectivamente¹⁴. Los autores de ese estudio propusieron que la falta de correlación entre niveles de producción de *slime* y la presencia de los genes *ica* podría deberse a la coexistencia de otros mecanismos de producción de *slime* en *S. aureus*.

Los resultados contradictorios obtenidos entre diferentes estudios sugieren no solo la presencia de diferentes mecanismos regulatorios de activación de la expresión de *biofilm*, sino también inconsistencias en la capacidad de detección de los métodos fenotípicos utilizados.

Existe escasa información acerca del rol específico de los polisacáridos de la matriz del *biofilm* en el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra mastitis por *S. aureus*. En un estudio se inmunizaron ovejas preñadas con bacterinas de *S. aureus* con alta o baja producción de *biofilm*, con extracto crudo de bacterias o con PNAG purificado, formulados con diferentes adyuvantes. La inmunización con bacterinas de cepas fuertemente productoras de *bio-*

film estimuló el desarrollo de una respuesta inmune humoral específica hacia PNAG que confirió protección parcial luego de un desafío experimental, evidenciado por menores recuentos de bacterias en leche y menor gravedad en las lesiones de la glándula mamaria, en comparación con el resto de las formulaciones evaluadas⁷⁷.

En un estudio posterior realizado por el mismo grupo, se inmunizaron vaquillonas preñadas con bacterinas de dos cepas de *S. aureus*, con alta o baja producción de polisacárido extracelular, al cual los autores denominaron complejo antigénico asociado a *slime* (*slime associated antigenic complex* [SAAC]), formuladas con un adyuvante de base oleosa. Los animales inmunizados con la cepa con alto contenido de SAAC desarrollaron altos niveles de IgG, IgG₁ e IgG₂ en sangre e IgG en leche específica para SAAC. Además presentaron menores recuentos de bacterias y menor gravedad en la sintomatología clínica luego del desafío experimental con una cepa heteróloga de *S. aureus*⁷⁹. Este desarrollo ha sido recientemente liberado al mercado (Startvac®. Laboratorios Hipra, S.A. autorizada por la Agencia Europea de Medicamentos –EMA).

Proteína de unión a fibronectina

Una de las propiedades patogénicas de *S. aureus* que ha sido difícil de evaluar *in vivo* es el papel de la invasión celular en el huésped durante la infección. Una vez que el patógeno invadió la glándula mamaria, este debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente. Es por ello que la adherencia, la supervivencia y la multiplicación de *S. aureus* en el epitelio mamario son eventos tempranos decisivos en la patogénesis de la infección⁴⁵. Este comportamiento protegería al patógeno de la respuesta inmune del huésped y del tratamiento con antibióticos, y contribuiría a su persistencia en el tejido mamario³⁵.

La capacidad de *S. aureus* de internalizarse en células epiteliales y fagocíticas no profesionales, como células endoteliales y fibroblastos, se considera uno de los atributos cruciales de la patogénesis de *S. aureus*. Apesar de la presencia de numerosas adhesinas en el microorganismo, la patogénesis estaría relacionada esencialmente con la expresión de proteínas de superficie de unión a fibronectina²¹ (*fibronectin binding proteins* [FnBPs]). Las proteínas FnBP-A y FnBP-B (codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, localizados en tándem en el cromosoma) se encuentran ancladas a la membrana de la pared celular de *S. aureus*. Cada proteína FnBP posee tres copias de un motivo D de 37-38 aminoácidos, llamados D1, D2 y D3. Las repeticiones D son altamente homólogas entre FnBP-A y FnBP-B. Cada dominio D puede unirse individualmente a la fibronectina (Fn), aunque con baja afinidad, pero al disponerse en tándem conforman un dominio de unión, D1-3, de alta afinidad⁴².

En un estudio realizado con una mutante isogénica de *S. aureus* deficiente en ambas FnBPs se observó una disminución del 40 % en la capacidad de esta cepa de adherirse a las MAC-T, comparada con la cepa salvaje¹⁹.

Otro factor importante en el mecanismo de adherencia está relacionado con la existencia de fibronectina (Fn) sanguínea. Fowler *et al.*²¹ observaron que, al enfrentar *S. aureus* a una línea celular de ratón en presencia de suero fetal

bovino carente de Fn, el nivel de invasión se redujo considerablemente, comparado con el uso de suero fetal bovino completo. Además, utilizando una línea mutante de fibroblastos de ratón deficiente en la expresión de la integrina $\beta 1$, se observó una reducción del 97 % en el nivel de invasión celular de *S. aureus*, comparado con una línea celular productora de integrina $\beta 1$. Basados en estos resultados, los autores propusieron un modelo de invasión en el cual la Fn formaría un puente entre la FnBP del patógeno y las integrinas del huésped, lo que conduciría a la internalización bacteriana²¹. Posteriormente, Brouillette *et al.*⁶ utilizaron un modelo de mastitis en ratón para evaluar una cepa de *S. aureus* mutante en los genes *fnbA* y *fnbB* y una salvaje. La presencia de las FnBPs en la cepa salvaje incrementó la capacidad bacteriana de colonizar las glándulas mamarias, aun bajo la presión ejercida por el amamantamiento, comparado con la cepa mutante.

Otro hecho que resalta la importancia de estas moléculas en la patogénesis de la infección por *S. aureus* es su presencia en la mayoría de las cepas, tanto bovinas como humanas. En un estudio realizado en Canadá con 62 aislamientos clínicos humanos, el 87 % poseía ambos genes *fnbA* y *fnbB*³. Asimismo, se detectó la presencia de ambos genes en el 97 % de un total de 18 cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística y 14 cepas aisladas de pacientes con neumonía, en Irlanda. Sin embargo, la capacidad de adherencia a Fn varió entre diferentes cepas, los aislamientos de pacientes con neumonía fueron los que presentaron mayor capacidad de unión⁶². En el caso de aislamientos bovinos, la amplificación del gen codificante de la FnBP-A resultó positiva en el 84 % de 229 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis en Bélgica⁷³.

En un estudio realizado sobre 85 cepas aisladas de casos de mastitis subclínicas en el sur de Brasil, el 63,5 % poseía los genes *fnbP*, y de ellos, 9 seleccionados al azar presentaron una alta expresión durante la fase de crecimiento exponencial *in vitro*, evaluado por PCR cuantitativa⁴⁶. Si bien existe escasa información sobre la prevalencia de los genes codificantes de FnBP en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas y sobre su papel específico en la colonización de la glándula mamaria, las observaciones realizadas indican la importancia potencial de estos antígenos como blancos para el desarrollo de vacunas contra IIM por *S. aureus*.

La inmunización de roedores con FnBP recombinante⁸⁴ o con péptidos sintéticos compuestos por los aminoácidos esenciales para la unión a Fn³⁹ generó anticuerpos capaces de interferir significativamente en la interacción entre FnBP y Fn. En un modelo de mastitis murina, se infectaron glándulas mamarias con suspensiones de *S. aureus* previamente opsonizadas con un antisuero específico para FnBP recombinante o con suspensiones de bacterias no opsonizadas. El número de bacterias recuperadas de glándulas inoculadas con *S. aureus* opsonizado resultó significativamente menor que el de glándulas infectadas con bacterias no opsonizadas, y se observó, además, menor daño al tejido mamario⁵³.

En un estudio preliminar, Nelson *et al.*⁶⁴ inmunizaron vaquillonas preñadas con una FnBP formulada con ISCOMs. Los animales vacunados presentaron altos niveles de anticuerpos específicos y ausencia de sintomatología clínica luego de un desafío intramamario, comparados con los animales del grupo control. En un estudio posterior, la inmunización de vaquillonas preñadas con una mezcla de plásmidos codi-

ficantes de los dominios D1 y D3 de la FnBP y ClfA, seguida de un booster con las proteínas recombinantes, indujo respuestas celulares y de anticuerpos significativas contra ambos antígenos. Además, proporcionó una protección parcial luego de un desafío experimental con *S. aureus*, determinada por una menor recuperación de bacterias en la leche y alivio de los síntomas clínicos, en comparación con los controles sin inmunizar⁸⁶.

Proteína de unión a fibrinógeno (*clumping factor*)

Otro componente de *S. aureus* propuesto como factor importante de virulencia es el receptor de fibrinógeno de superficie celular, denominado factor de agregación³⁴ (*clumping factor* [Clf]). El Clf se encuentra presente en la mayoría de las cepas de *S. aureus* humanas y bovinas^{46,73}, y debe su nombre a que su interacción con el fibrinógeno plasmático conduce a una aglomeración instantánea de las células bacterianas. Se han descrito dos factores de agregación, ClfA y ClfB. El ClfA es una proteína compuesta por 933 aminoácidos. La secuencia señal de 39 residuos se ubica en el extremo N-terminal, seguido de una región A de 520 residuos que contiene el dominio de unión a fibrinógeno. Luego le sigue una región R de 308 residuos, compuesta por 154 repeticiones del dipéptido serina-aspartato. La función de la región R es actuar como soporte para permitir que el dominio de unión al ligando sea expuesto en forma funcional en la superficie celular³³. El ClfB también se encuentra asociado a la pared celular de *S. aureus* y posee una organización estructural similar a la del ClfA, una secuencia señal seguida de una región A de 540 residuos, luego una región repetitiva R y finalmente el dominio de anclaje a membrana. Los dominios N- y C-terminal de ambas proteínas comparten un 41 y un 47 % de su secuencia nucleotídica, respectivamente, mientras que la región A solo posee un 26,3 % de identidad⁶⁵. El ClfB se une a las cadenas α y β del fibrinógeno, mientras que el ClfA solo reaccionaría con la cadena γ ^{57,65}.

Se ha sugerido que el ClfB se expresa solo durante la fase temprana de crecimiento exponencial y que luego sería degradado de la superficie por proteasas bacterianas⁶⁵, mientras que el ClfA estaría presente en todo el ciclo de crecimiento³³. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en un modelo murino de bacteriemia e infección de herida con diferentes cepas de *S. aureus* se demostró que la expresión del ClfA es heterogénea y dependiente del microambiente de infección y de la cepa utilizada⁶³. El cultivo de *S. aureus* en presencia de altas concentraciones de IL-1 β favoreció la expresión de ARNm de ClfA y FnBP, lo que sugiere que el entorno inflamatorio desarrollado por el huésped podría influenciar el potencial patogénico del microorganismo⁴³.

Higgins *et al.*³⁸ evaluaron las propiedades antifagocíticas del ClfA ante PMN humanos *in vitro*. La fagocitosis de la cepa Newman salvaje se vio significativamente inhibida: fue ingerida por aproximadamente un 46 % de PMN, comparado con un 72 % para la cepa mutante en el gen *clfa*. Además, las propiedades antifagocíticas de la cepa productora de ClfA aumentaron en presencia de fibrinógeno soluble. Estos resultados llevaron a proponer dos mecanismos de resistencia a la fagocitosis, uno dependiente de fibrinógeno y

otro independiente de aquel, y esto reflejaría la presencia de diferentes nichos para la bacteria dentro del huésped durante la progresión de la infección, según el fibrinógeno se encuentre o no disponible³⁸.

Otro mecanismo de inhibición de fagocitosis propuesto sería la escisión del componente C3b del sistema complemento en su forma inactiva iC3b, mediante el factor de complemento I. Cuando *S. aureus* se encuentra opsonizado con C3b, el C1fA sería capaz de localizar al factor I en la superficie celular y además actuar como cofactor, aumentando así su actividad y favoreciendo el pasaje de C3b a iC3b, inhibiendo de esta forma la activación de la cascada del complemento³⁰.

En investigaciones realizadas en ratones, la inmunización con un plásmido codificante del C1fA indujo una fuerte producción de anticuerpos específicos que favorecieron la fagocitosis *in vitro* de *S. aureus* por macrófagos murinos. Las bacterias preincubadas con los anticuerpos generados mostraron menor virulencia en un modelo de mastitis murina. Sin embargo, la inmunización con la vacuna a ADN no fue efectiva para proteger a los ratones de un desafío intraperitoneal⁵.

En ratones, la administración intranasal de una mezcla de vectores plasmídicos codificantes de cuatro adhesinas de *S. aureus*, entre ellas C1fA, indujo niveles elevados de anticuerpos específicos, los cuales inhibieron la adhesión de la bacteria a células epiteliales mamarias y protegieron contra la infección de las glándulas mamarias murinas¹¹. Tuchscher *et al.*⁹⁵ inmunizaron pasivamente ratones lactantes con anticuerpos anti-CP5, anti-C1fA y con una mezcla de ellos. Los ratones inmunizados con los anticuerpos individuales tuvieron menores recuentos bacterianos en los tejidos luego de 4 días de realizado el desafío experimental con una cepa productora de CP5, con respecto a los animales control. La inmunización con la combinación de anticuerpos tuvo un efecto sinérgico, esto logró disminuir significativamente la carga bacteriana en las glándulas mamarias y evitó el desarrollo de mutantes no encapsuladas⁹⁵.

En un estudio reciente, la inmunización de ratones con un péptido que contenía la región A del C1fA indujo niveles significativamente mayores de anticuerpos específicos que una suspensión de células enteras de *S. aureus* inactivadas, los cuales fueron capaces de favorecer la fagocitosis por PMN bovinos²⁶. Luego de una infección intramamaria experimental, los animales inmunizados con el antígeno recombinante presentaron menores recuentos de bacterias en las glándulas mamarias y mayor preservación de la integridad tisular²⁶.

En cuanto a la evaluación en bovinos, la inmunización de animales con plásmidos que contienen la secuencia codificante de la región A del C1fA indujo una fuerte respuesta de anticuerpos anti-C1fA en sangre y leche, en comparación con animales inmunizados con plásmidos vacíos. Los anticuerpos resultaron eficientes en favorecer la opsonofagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos *in vitro* y bloquear la adherencia del microorganismo a células epiteliales MAC-T. Luego de un *booster* con el antígeno recombinante, la respuesta humoral se vio significativamente incrementada, así como la funcionalidad de los anticuerpos generados en cuanto a su capacidad de opsonización e inhibición de la adherencia celular⁶⁹.

Toxina alfa

La α -toxina es una proteína tóxica para un amplio rango de células de mamífero, particularmente eritrocitos; su función principal es convertir el tejido del huésped en nutrientes para la bacteria que la expresa¹⁶. El gen de α -toxina (*hla*) contiene un marco de lectura abierto de 1002 pb. El producto primario del gen posee una secuencia líder de 26 aminoácidos con características de secuencia señal, involucrada en la secreción. La proteína madura tiene un peso molecular de 33 000 Da y contiene solo tres regiones cortas de alta hidrofobicidad, sumadas a un mayor número de regiones cortas débilmente hidrofóbicas²⁸. La toxina se une a las membranas de las células blanco en su forma monomérica y luego se oligomeriza para formar poros heptaméricos. El dominio de unión a la membrana penetra la bicapa lipídica, formando una barrera anfipática con un diámetro interno de aproximadamente 1,5-2 nm⁵⁸. La toxicidad celular se alcanza rápidamente debido a la destrucción de la membrana plasmática, la pérdida de iones celulares y la liberación de compuestos tóxicos a través de los poros⁶⁰.

La α -toxina de *S. aureus* fue descrita como un factor clave en la supervivencia intracelular del patógeno. Mestre *et al.*⁶⁰ incubaron células CHO con α -toxina purificada, o las infectaron con una cepa salvaje de *S. aureus*, con una mutante en el gen *hla* o con una mutante complementada con un plásmido codificante de la toxina. Los resultados obtenidos indicaron que, si bien la α -toxina participa en la activación de la vía autofágica, dicha respuesta no fue funcional, ya que no finalizó con la degradación lisosomal. Además, observaron que luego de 4 horas de infección con las cepas productoras de α -toxina, una mayor cantidad de bacterias escapaban de la vesícula del fagosoma, e incluso presentaban signos de división celular, mientras que las bacterias mutantes permanecieron en las vesículas y no presentaron signos de replicación⁶⁰. La α -toxina de *S. aureus* contribuiría también a la muerte celular de eosinófilos. En ensayos realizados *in vitro*, eosinófilos humanos se incubaron con sobrenadante de cultivo de una cepa salvaje productora de α -toxina, y se observó una necrosis temprana seguida de una significativa disminución en el número de células, en comparación con la incubación con la cepa mutante en el gen *hla*⁶⁰.

Estudios precursores realizados en modelos murinos evaluaron el rol patogénico de la α -toxina en la infección mamaria utilizando cepas mutantes en su gen *hla*. La presencia de α -toxina en las cepas salvajes se asoció con mayores recuentos bacterianos en las glándulas mamarias infectadas y signos clínicos más graves, incluso muerte, en comparación con la infección por cepas mutantes⁴. Más tarde, Cifrian *et al.*¹³ demostraron que el tratamiento previo de monocapas de células epiteliales de glándula mamaria con α -toxina incrementó su susceptibilidad a la adherencia de *S. aureus*, y que esta se incrementaba con el tiempo de exposición a la α -toxina. En un estudio reciente, el tratamiento de un cultivo primario de células epiteliales mamarias con α -toxina incrementó la muerte celular, la degradación del ADN genómico y la producción de especies reactivas de oxígeno, de manera dependiente de la dosis⁸⁵.

Existen resultados discordantes en cuanto a la prevalencia de cepas productoras de α -toxina entre *S. aureus* aislados de mastitis bovinas. En un estudio en el cual se seroti-

pificaron 262 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas en EE. UU., el 94,3 % resultaron positivas para α -toxina⁴⁴. Sin embargo, en un estudio posterior realizado en Dinamarca con 105 cepas de *S. aureus*, se observó que si bien el 100 % de ellas presentaban el gen *hla*, solo el 37 % produjeron la toxina *in vitro*¹. Recientemente, Ote *et al.*⁷³ investigaron la presencia de los genes codificantes de las hemolisinas de *S. aureus* en 229 cepas aisladas de mastitis bovinas en Bélgica; el 98,7 % de las cepas fueron positivas para *hla*.

Respecto de su potencial como inmunógeno para mastitis, en un estudio se inmunizaron repetidamente vacas en lactancia con α -toxina, α -toxina más CP5 o α -toxina conjugada a CP5, formuladas con adyuvante incompleto de Freund. El desafío intramamario con α -toxina 2 semanas después de la inmunización indujo un reclutamiento celular masivo en los cuartos desafiados, con incremento de los niveles de anticuerpos específicos anti- α -toxina, no observado en los cuartos de los controles sin inmunizar. Durante la fase temprana de la respuesta inflamatoria los PMN representaron más del 90 % de las células en leche de cuartos inflamados, los cuales fueron luego reemplazados por células mononucleares³⁷.

En un estudio de inmunización de conejos, se comparó el desempeño de una vacuna experimental compuesta por una cepa capsulada de *S. aureus* aislada de mastitis bovina gangrenosa y extracto crudo de α -toxina, formulada con 4 adyuvantes diferentes. Todas las formulaciones indujeron la producción de anticuerpos IgG específicos para α -toxina a las 8 semanas posinmunización³². Recientemente, la inmunización de conejos con α -toxina recombinante conjugada a una variante sintética desacetilada de PNAG indujo títulos altos de IgG específica hacia ambos componentes vacunales, los cuales inhibieron la actividad hemolítica de la toxina nativa frente a glóbulos rojos de conejo. Además, la inmunización pasiva de ratones con los anticuerpos generados en conejo disminuyó los recuentos de *S. aureus* en pulmón, luego de un desafío experimental⁷⁸.

Toxina beta

La β -toxina de *S. aureus* es una exoproteína hemolítica que hidroliza la esfingomielina presente en la membrana plasmática, lo cual resulta en un incremento de la permeabilidad con pérdida progresiva de la carga de la superficie celular⁵⁶. Observaciones iniciales indicaron la predominancia de cepas productoras de β -toxina entre *S. aureus* aislados de mastitis bovinas⁷, esto hizo suponer que dicha toxina tenía un papel importante en la patogénesis de la infección mamaria por *S. aureus*. Más tarde, en un estudio donde se evaluó por PCR la presencia del gen que codifica la toxina (*hlb*) en 105 cepas aisladas de casos de mastitis bovinas, el 96 % resultaron positivas, aunque solo el 72 % de ellas presentaron actividad hemolítica por β -toxina en agar sangre¹. Larsen *et al.*⁴⁸ confirmaron esta prevalencia mostrando que el 97 % de las cepas aisladas de mastitis bovinas en Europa y EE. UU. poseían el gen codificante de β -toxina o mostraban acción hemolítica por esta toxina en agar sangre. En un estudio reciente realizado en Bélgica en el que se caracterizaron genotípicamente 229 aislamientos bovinos, el 99 % presentó el gen *hlb*⁷³.

Se ha demostrado que la β -toxina de *S. aureus* es capaz de actuar sobre neutrófilos⁵⁴ y linfocitos, específicamente linfocitos T proliferativos⁴⁰. Debido a las probables contaminaciones de las preparaciones de toxina con trazas de otras citolisinas y a la susceptibilidad diferencial entre especies, se han informado resultados variables en cuanto a los efectos de la toxina sobre leucocitos. Marshall *et al.*⁵⁴ demostraron por microscopía electrónica y ensayos biológicos que tanto linfocitos como neutrófilos humanos son sensibles a la β -toxina, y que la citotoxicidad se ve incrementada en presencia de Mg^{++} . Sin embargo, ambos tipos celulares se consideran menos sensibles que los eritrocitos ovinos, probablemente debido a un menor contenido de esfingomielina en la membrana celular.

Utilizando un modelo de mastitis murino se estudió la actividad de la toxina en términos de mortalidad, de cambios clínicos y microscópicos y de recuperación de microorganismos de las glándulas mamarias, evaluando la toxina parcialmente purificada o una cepa aislada de mastitis bovina productora solamente de β -toxina. La toxina parcialmente purificada produjo solo una leve infiltración de neutrófilos en los alvéolos, mientras que la inoculación de una cepa de *S. aureus* productora de β -toxina, pero no de α -toxina y δ -toxina, generó lesiones vasculares graves con presencia de bacterias asociadas⁸, lo cual sugiere que el papel patogénico de la β -toxina podría estar influenciado por la interacción con otras enzimas y toxinas que dañan la membrana. De hecho, en un estudio *in vitro* con células humanas realizado de manera reciente, se observó que la β -toxina afecta linfocitos de sangre periférica, específicamente células T proliferativas, actuando así en la evasión de los mecanismos inmunes mediante la interacción con factores de virulencia accesorios, como por ejemplo superantígenos⁴⁰.

Debido a la dificultad metodológica para obtener preparaciones puras de toxinas es que cobraron importancia los estudios realizados con cepas mutantes deficientes en aquellas. Sin embargo, existen pocos antecedentes de experimentaciones con este tipo de cepas y los resultados han sido poco concluyentes. En 1989, Bramley *et al.*⁴ generaron mutantes deficientes en la toxina mediante lisogenización con un bacteriófago integrado en el gen codificante. Las glándulas inoculadas con *S. aureus* productores de toxina mostraron recuentos significativamente mayores que aquellas inoculadas con las cepas mutantes, así como un mayor número de PMN y macrófagos. Los ratones infectados con las cepas toxigénicas murieron o presentaron signos más graves de enfermedad, en comparación con los infectados con las cepas mutantes. En un estudio posterior, se generaron cepas mutantes deficientes en β -toxina mediante la inactivación del gen *hlb* por inserción de un gen de resistencia a gentamicina en su secuencia. La presencia de β -toxina se asoció con un incremento en la adherencia de *S. aureus* a células epiteliales mamarias y a una mayor proliferación del microorganismo, en comparación con la cepa mutante¹². Los autores propusieron que el efecto de la β -toxina en el incremento de la adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales de la glándula mamaria se debería a un cambio en la carga de la superficie de las células dañadas.

Shompole *et al.*⁸⁷ demostraron que el escape de *S. aureus* de los endosomas coincide con un pico de expresión de los

Tabla 1 Factores de virulencia de *S. aureus* evaluados como inmunógenos en modelos animales de mastitis bovina

	Modelo animal	Características del antígeno	Referencia
Polisacáridos capsulares (CPs)	Bovino	CP5 conjugado a ovoalbúmina	23
	Bovino	CP5 conjugado a albumina sérica humana	93
	Murino	CP8 conjugado a exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
<i>Biofilm</i>	Ovino	PNAG purificado	77
Proteína de unión a fibronectina A (FnBP-A)	Murino	FnBP recombinante	84
	Murino	Péptidos sintéticos	39
	Bovino	FnBP recombinante	64
<i>Clumping factor A</i> (ClfA)	Murino	Vacuna a ADN	5
	Murino	Inmunización pasiva	95
	Murino	Péptido recombinante	26
	Bovino	Vacuna a ADN + <i>booster</i> con el antígeno recombinante	69
	Bovino	α -toxina nativa purificada	37
Toxinas	Conejo	<i>S. aureus</i> capsulado + extracto crudo de α -toxina	32
	Conejo	α -toxina recombinante conjugada a dPNAG	78
	Bovino	<i>S. aureus</i> capsulado + toxoides α y β	67, 68
Multicomponentes	Conejo	CP5 purificado + sobrenadante de cultivo de una cepa productora de α -toxina + FnBP recombinante	75
	Bovino	Plásmidos codificantes para ClfA y FnBP-A + <i>booster</i> con las proteínas recombinantes	86
	Murino	Plásmidos codificantes para las proteínas FnBP-A, ClfA, proteína de unión a fibrinógeno y proteína de unión a colágeno	11

Se incluyen solo aquellas formulaciones con antígenos definidos, purificados o parcialmente purificados.

genes *hla* y *hnb*, y que el daño a las membranas citoplasmáticas de las células infectadas ocurre luego de un segundo pico de producción, por lo que argumentaron que la β -toxina podría estar implicada tanto en la ruptura de la membrana del endosoma, lo cual conduciría al escape de la bacteria al citoplasma, como en la apoptosis celular. En una investigación reciente, una cepa de *S. aureus* doble mutante deficiente en las moléculas β -toxina y catalasa mostró un incremento de la persistencia intracelular *in vitro* en cultivos de macrófagos murinos y células MAC-T, y aumento de la virulencia en ratones, en comparación con las mutantes simples o la cepa salvaje⁶⁵. Sin embargo, el mecanismo por el cual estas dos moléculas contribuirían sinérgicamente a la patogénesis intracelular de *S. aureus* en dicha línea celular no ha sido dilucidado.

Existen pocos antecedentes de la utilización de β -toxina en preparaciones de inmunógenos destinadas al control de IIM por *S. aureus*. En un estudio realizado en Noruega, se inmunizaron vaquillonas preñadas con un inmunógeno compuesto por una mezcla de una cepa de *S. aureus* capsulada inactivada y los toxoides α y β . Los animales inmunizados desarrollaron niveles elevados de IgG anti-cápsula y anti- α -toxina, aunque los niveles de anticuerpos específicos para β -toxina no difirieron significativamente de los contro-

les⁶⁶. Sin embargo, las formulaciones no resultaron efectivas para reducir la aparición de mastitis clínicas o subclínicas de forma significativa⁶⁷.

En un estudio con vacas en lactancia, Hwang *et al.*⁴¹ aislaron cepas de *S. aureus* productoras de α y β hemólisis de vacas con mastitis subclínicas, y a partir de dichas cepas realizaron preparaciones de bacterinas suplementadas con sobrenadante de cultivo formalinado, que utilizaron para la inmunización autógena de los animales infectados. La inmunización indujo un incremento significativo de los anticuerpos específicos en sangre y leche, en comparación con los animales controles. El 27 % de los cuartos infectados tuvieron cura bacteriológica luego de la inmunización, mientras que en solo un 5 % de los cuartos del grupo se observó curación. Además, no se registraron nuevos cuartos infectados en los animales inmunizados, mientras que 3 cuartos en el grupo control presentaron nuevas IIM⁴¹.

Conclusión

Los resultados de efectividad parcial de los estudios realizados con antígenos individuales condujeron a la propuesta de que una vacuna ideal contra las IIM causadas por *S. au-*

reus necesitaría contener múltiples antígenos que bloqueen la adherencia, neutralicen toxinas, aumenten la vigilancia inmunológica o bloqueen pasos clave en la patogénesis estafilocócica⁶¹. Si bien la estrategia de preparación de inmunógenos a partir de bacterinas o lisados de *S. aureus* suplementados con toxoides inactivados, productos capsulares o productos bacterianos extracelulares fue utilizada desde épocas tempranas⁷⁶, los componentes de varias de las formulaciones evaluadas no fueron exactamente caracterizados. Por otro lado, existen pocos antecedentes sobre el uso de inmunógenos multicomponentes compuestos por antígenos definidos destinados al control de IIM causadas por *S. aureus* y, en su mayoría, no fueron evaluados en modelos bovinos^{1,75,86}. Aun cuando los resultados obtenidos en estos estudios sugieren la inducción de una respuesta inmune que contribuiría a la protección contra la infección por *S. aureus*, estos deben interpretarse con precaución debido a diferencias entre los distintos modelos animales utilizados. En la tabla 1 se resumen los factores de virulencia de *S. aureus* evaluados como inmunógenos en modelos de mastitis, incluyendo solo las formulaciones con antígenos definidos, purificados o parcialmente purificados.

Otros de los motivos propuestos para explicar por qué los inmunógenos evaluados hasta el momento no han resultado completamente eficaces es que una protección adecuada no se lograría solamente con la estimulación de una respuesta inmune humoral, sino que también debería estar acompañada de una respuesta local mediada por células⁶¹. La estimulación de linfocitos T capaces de producir IFN- γ en respuesta al encuentro con el patógeno sería una de las claves para la erradicación de los estafilococos intracelulares a través de la activación de células fagocíticas²⁵. Otros autores sugieren que la vía de administración del inmunógeno así como el adyuvante utilizado para la formulación deberían inducir tanto la producción de anticuerpos con capacidad opsonica como el reclutamiento de neutrófilos activados⁹⁸. La inclusión de inmunopotenciadores capaces de desencadenar respuestas inmunes innatas tempranas que colaboren en la generación de respuestas inmunes adaptativas robustas y duraderas es crucial para incrementar la eficacia de las vacunas.

La combinación de componentes bacterianos que cumplan un rol determinante, tanto en las primeras etapas de la interacción huésped-patógeno como en la evasión del sistema inmune, y en etapas más avanzadas de la infección, formulados con adyuvantes capaces de generar respuestas humorales/ celulares balanceadas, amerita ser evaluada en futuros desarrollos de vacunas contra mastitis estafilocócicas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por las siguientes fuentes: PICT N.º 1175 (ANPCyT), AESA 203992 (INTA) y PNLEC 1601 (INTA).

Bibliografía

1. Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsborg CS, Jensen NE. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS*. 1999;107:425-30.
2. Aguilar B, Amorena B, Iturralde M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2001;78:183-91.
3. Amorena B, Gracia E, Monzón M, Leiva J, Oteiza C, Pérez M, Alabart JL, Hernández-Yágo J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44:43-55.
4. Bramley AJ, Patel AH, O'Reilly M, Foster R, Foster TJ. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect Immun*. 1989;57:2489-94.
5. Brouillette E, Lacasse P, Shkreta L, Bélanger J, Grondin G, Diarra MS, Fournier S, Talbot BG. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2002;20:2348-57.
6. Brouillette E, Talbot BG, Malouin F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect Immun*. 2003;71:2292-5.
7. Bryce LM, Fountree PM. The production of β -toxin by staphylococci. *J Pathol*. 1936;43:173-89.
8. Calvino LF, Donnelly WJ, Dodd K. Effect of partially purified *Staphylococcus aureus* beta-haemolysin on the mammary gland of the mouse. *J Vet Med*. 1993;40:559-68.
9. Camussone C, Pejř P, Pujato N, Schwab A, Marcipar I, Calvino L. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. *Braz J Microbiol*. 2012;43:1010-14.
10. Camussone CM, Veaute CM, Porporatto C, Morein B, Marcipar IS, Calvino LF. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *J Dairy Res*. 2013;80:72-80.
11. Castagliuolo I, Piccinini R, Beggiao E, Palù G, Mengoli C, Ditadi F, Vicenzoni G, Zecconi A. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine*. 2006;24:4393-402.
12. Cifrian E, Guidry AJ, Bramley AJ, Norcross NL, Bastida-Corcuera FD, Marquardt WW. Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol*. 1996;48:187-98.
13. Cifrian E, Guidry AJ, O'Brien CN, Marquardt WW. Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured teat, ductal and secretory mammary epithelial cells. *Res Vet Sci*. 1995;58:20-5.
14. Coelho SM, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MM. Short communication: profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *J Dairy Sci*. 2011;94:3305-10.
15. Dhanawade NB, Kalorey DR, Srinivasan R, Barbudhe SB, Kurkure NV. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet Res Commun*. 2010;34:81-9.
16. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:16-34.
17. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:167-93.

18. Dunne Jr. WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiol Rev.* 2002;15:155-66.
19. Dziejawska K, Patti JM, Deobald CF, Bayles KW, Trumble WR, Bohach GA. Fibronectin-binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect Immun.* 1999;67:4673-8.
20. Fournier C, Kuhnert P, Frey J, Miserez R, Kirchhofer M, Kaufmann T, Steiner A, Graber HU. Bovine *Staphylococcus aureus* association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res Vet Sci.* 2008;85:439-48.
21. Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol.* 2000;79:672-9.
22. Fox LK, Zadoks FN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol.* 2005;107:295-9.
23. Gilbert FB, Poutrel B, Sutra L. Immunogenicity in cows of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide-ovalbumin conjugate. *Vaccine.* 1994;12:369-74.
24. Giraudo JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraudo AT, Bogni C, Larriestra A, Nagel R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J Dairy Sci.* 1997;80:845-53.
25. Gómez MI, Sordelli DO, Buzzola FR, García VE. Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mouse mammary gland by local immunization with a live attenuated mutant. *Infect Immun.* 2002;70:4254-60.
26. Gong R, Hu C, Xu H, Guo A, Chen H, Zhang G, Shi L. Evaluation of clumping factor A binding region A in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17:1746-52.
27. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002;43:1367-78.
28. Gray G, Kehoe M. Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. *Infect Immun.* 1984;46:615-8.
29. Guidry A, Fattom A, Patel A, O'Brien C. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Vet Microbiol.* 1997;59:53-8.
30. Hair PS, Echague CG, Sholl AM, Watkins JA, Geoghegan JA, Foster TJ, Cunnion KM. Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of *Staphylococcus aureus* and decreases complement-mediated phagocytosis. *Infect Immun.* 2010;78:1717-27.
31. Han HR, Pak S, Guidry A. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. *J Vet Med Sci.* 2000;62:1331-3.
32. Han HR, Park HM. Effects of adjuvants on the immune response of staphylococcal alpha toxin and capsular polysaccharide (CPS) in rabbit. *J Vet Med Sci.* 2000;62:237-41.
33. Hartford O, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Mol Microbiol.* 1997;25:1065-76.
34. Hawiger J, Timmons S, Strong DD, Cottrell CA, Riley M, Doolittle RF. Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor. *Biochemistry.* 1982;21:1407-13.
35. Hebert A, Sayasith K, Senechal S, Dubreuil P, Lagace J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;193:57-62.
36. Hensen SM, Pavčić MJ, Lohuis JA, de Hoog JA, Poutrel B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 *in situ*. *J Dairy Sci.* 2000;83:1966-75.
37. Herbelin C, Poutrel B, Gilbert FB, Rainard P. Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with staphylococcal alpha-toxin. *J Dairy Sci.* 1997;80:2025-34.
38. Higgins J, Loughman A, van Kessel KP, van Srijp JA, Foster TJ. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;258:290-6.
39. Huesca M, Sun Q, Peralta R, Shivji GM, Sauder DN, McGavin MJ. Synthetic peptide immunogens elicit polyclonal and monoclonal antibodies specific for linear epitopes in the D motifs of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein, which are composed of amino acids that are essential for fibronectin binding. *Infect Immun.* 2000;68:1156-63.
40. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2007;189:8719-26.
41. Hwang CY, Pak SI, Han HR. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J Vet Med Sci.* 2000;62:875-80.
42. Jonsson K, Sgnas C, Muller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 1991;202:1041-8.
43. Kanangat S, Postlethwaite A, Cholera S, Williams L, Schaberg D. Modulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by interleukin-1beta: novel implications in bacterial pathogenesis. *Microbes Infect.* 2007;9:408-15.
44. Kenny K, Bastida FD, Norcross NL. Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Can J Vet Res.* 1992;56:265-8.
45. Kerro Deogo O, Van Dijk J, Nederbragt H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staph. aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. *Vet Q.* 2002;24:181-98.
46. Klein RC, Fabres-Klein MH, Brito MA, Fietto LG, Ribon Ade O. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet Microbiol.* 2012;160:183-8.
47. Krukowski H, Szymankiewicz M, Lisowski A. Sime production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of bovine mastitis. *Pol J Microbiol.* 2008;57:253-5.
48. Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet. Microbiol.* 2002;85:61-7.
49. Lee CY, Lee JC. Staphylococcal capsule. En: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Fiod JI, editores. Gram-positive pathogens. Washington DC, ASM Press, 2006, p. 456-63.
50. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339:520-32.
51. Ma J, Cocchiario J, Lee JC. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J Dairy Sci.* 2004;87:178-82.
52. Maira-Litrán T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G 3rd, Goldmann DA, Fler GB. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun.* 2002;70:4433-40.
53. Mamo W, Jonsson P, Müller HP. Opsonization of *Staphylococcus aureus* with a fibronectin-binding protein antiserum induces protection in mice. *Microb Pathog.* 1995;19:49-55.

54. Marshall MJ, Bohach GA, Boehm DF. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J Nat Toxins*. 2000;9:125-38.
55. Martínez-Pulgarín S, Domínguez-Bernal G, Orden JA, de la Fuente R. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. *Microbiology*. 2009;155:1505-15.
56. McCartney AC, Arbutnot JP. Mode of action of membrane-damaging toxins produced by staphylococci. En: Jeljaszewicz J, editor. *Bacterial Toxins and Cell Membranes*. Londres, Academic Press, 1978, p. 89-127.
57. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, Foster T, Höök M. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem*. 1997;247:416-24.
58. Meesters C, Brack A, Hellmann N, Decker H. Structural characterization of the alpha-hemolysin monomer from *Staphylococcus aureus*. *Proteins*. 2009;75:118-26.
59. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J*. 2006;171:398-407.
60. Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI. Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus* infected cells. *Autophagy*. 2010;6:110-25.
61. Middleton JR. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7:805-15.
62. Mongodiem E, Bajolet O, Outrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle O, Benzman S. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun*. 2002;70:620-30.
63. Nanra JS, Timofeyeva Y, Buitrago SM, Sellman BR, Dilts DA, Fink P, Nunez L, Hagen M, Matsuka YV, Mininni T, Zhu D, Pavliak V, Green BA, Jansen KU, Anderson AS. Heterogeneous in vivo expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*: implications for vaccine design. *Vaccine*. 2009;27:3276-80.
64. Nelson L, Flock JI, Höök M, Lindberg M, Müller HP, Wädström T. Adhesins in staphylococcal mastitis as vaccine components. *Flem Vet J*. 1991;62:111-5.
65. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P, Vaudaux P, Höök M, Foster TJ. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 1998;30:245-57.
66. Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection, and mammary histology in nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 1993;76:1290-7.
67. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci*. 1994a;77:1267-75.
68. Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. *J Dairy Sci*. 1994b;77:1276-84.
69. Nour E-Din AN, Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 2006;24:1997-2006.
70. Novick RP. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol*. 2003;48:1429-49.
71. Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Vilela CL. Invasive potential of biofilm-forming staphylococci bovine subclinical mastitis isolates. *J Vet Sci*. 2011;12:95-7.
72. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:218-34.
73. Ote I, Taminiou B, Duprez JN, Dizier I, Mainil JG. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 2011;153:285-92.
74. Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7:109-21.
75. Park HM, Yoo HS, Oh TH, Kim D, Han HR. Immunogenicity of alpha-toxin, capsular polysaccharide (CPS) and recombinant fibronectin-binding protein (r-FnBP) of *Staphylococcus aureus* in rabbit. *J Vet Med Sci*. 1999;61:995-1000.
76. Pereira UP, Oliveira DGS, Mesquita LR, Costa GM, Pereira LJ. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Vet Microbiol*. 2011;148:117-24.
77. Pérez MM, Prenafeta A, Valle J, Penadés J, Bota C, Solano C, Marco J, Grilló MJ, Lasa I, Irache JM, Maira-Litran T, Jiménez-Barbero J, Costa L, Pler GB, de Andrés D, Amorena B. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*. 2009;27:2379-86.
78. Pozzi C, Wilk K, Lee JC, Gening M, Nifantiev N, Pler GB. Opsonic and protective properties of antibodies raised to conjugate vaccines targeting six *Staphylococcus aureus* antigens. *PLoS One*. 2012;7:e46648.
79. Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. 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. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;134:208-17.
80. Prince LR, Graham KJ, Connolly J, Anwar S, Fidler R, Sabroe I, Foster SJ, Whyte MK. *Staphylococcus aureus* induces eosinophil cell death mediated by α -hemolysin. *PLoS One*. 2012;7:e31506.
81. Projan SJ, Novick RP. The molecular basis of pathogenicity. En: Crossley KB, Archer GL, editores. *The staphylococci in human disease*. Nueva York, Churchill Livingstone, 1997, p. 55-81.
82. Feinosa EB, El-Sayed A, Lämmler C, Bogni C, Zschöck M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiol Res*. 2008;163:314-22.
83. Rice K, Huesca M, Vaz D, McGavin MJ. Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in *Staphylococcus aureus*: identification of antigenic variation in a fibronectin-binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant *S aureus*. *Infect Immun*. 2001;69:3791-9.
84. Schennings T, Heimdahl A, Coster K, Flock JI. Immunization with fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microb Pathog*. 1993;15:227-36.
85. Seol JW, Kang SJ, Park SY. Silver ion treatment of primary cultured bovine mammary gland epithelial cell (BMEC) damage from *Staphylococcus aureus*-derived alpha-toxin. *Vet Res Commun*. 2010;34:33-42.
86. Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P. Immune responses to a DNA protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*. 2004;23:114-26.
87. Shompole S, Henon KT, Liou LE, Dziewanowska K, Bohach GA, Bayles KW. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol Microbiol*. 2003;49:919-27.
88. Sordelli DO, Buzzola FR, Gomez MI, Steele-Moore L, Berg D, Gentilini E, Catalano M, Reitz AJ, Tollersrud T, Denamiel G, Jeric P, Lee JC. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J Clin Microbiol*. 2000;38:846-50.

89. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
90. Sutra L, Rainard P, Poutrel B. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2253-8.
91. Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *Pol J Microbiol.* 2012;61:65-9.
92. Tollersrud T, Kenny K, Reitz AJ, Lee JC. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2998-3003.
93. Tollersrud T, Zernichow L, Andersen SR, Kenny K, Lund A. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine.* 2001;19:3896-903.
94. Tuchscher L, Löffler B, Buzzola FR, Sordelli DO. *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiol.* 2010;5:1823-32.
95. Tuchscher LP, Buzzola FR, Alvarez LP, Lee JC, Sordelli DO. 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.* 2008;76:5738-44.
96. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 2003;92:179-85.
97. Verdier I, Durand G, Bes M, Taylor K, Lina G, Vandenesch F, Fattom A, Etienne J. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J Clin Microbiol.* 2007;45:725-9.
98. Yancey RJ Jr. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv Vet Med.* 1999;41:257-73.
99. Zeconi A, Calvino LF, Fox KL. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *IDF Bulletin.* 2006;408:1-36.
100. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 2008;86:57-65.