



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

TESIS

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA VARIANTE DE
COLONIA PEQUEÑA DE *Staphylococcus aureus*: EVALUACIÓN DE
LA PERSISTENCIA EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS
BOVINAS

QUE PRESENTA:

IBQ. MINERVA FRUTIS MURILLO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR: DC. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

CO-DIRECTORA: DC. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN, MARZO DE 2018

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (proyecto 14.5) y del CONACyT (proyecto CB-2013-01-221363 y la beca 598586

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.2 Internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> en células fagocíticas no profesionales.....	3
2.3 Variantes de colonia pequeña en <i>S. aureus</i>	4
2.4 Factores de virulencia en <i>S. aureus</i> y en variantes de colonia pequeña.....	8
2.5 Infecciones causadas por SCVs de <i>S. aureus</i>	11
2.6 Mastitis bovina.....	11
2.7 Respuesta inmune innata de las CEMB durante la infección por <i>S. aureus</i> y las SCVs	12
2.8 <i>S. aureus</i> induce apoptosis en las CEMB.....	14
3. ANTECEDENTES.....	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. HIPÓTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
6.1 Objetivo general.....	20
6.2 Objetivos específicos.....	20
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22

8.1 Reactivos y cepas	22
8.2 Inducción de variantes de colonia pequeña.....	22
8.3 Pruebas de estabilidad de las variantes de colonias pequeñas.....	22
8.4 Pruebas de identificación de las variantes de colonias pequeñas	22
8.5 Extracción de ARN y análisis de la expresión de genes de virulencia de <i>S. aureus</i>	23
8.6 Evaluación del metabolismo de sustratos únicos (Biolog).....	25
8.7 Evaluación de la formación de biofilm.....	25
8.8 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	26
8.9 Cultivo primario de CEMB.....	27
8.10 Evaluación de la persistencia intracelular de <i>S. aureus</i> en las CEMB.....	28
8.11 Evaluación de la inducción de apoptosis por la clona SCV- ATCC27543.....	28
8.12 Análisis de datos.....	29
9. RESULTADOS.....	30
9.1 Generación de una variante de colonia pequeña de <i>S. aureus</i> ATCC27543.....	30
9.2 Caracterización de la clona SCV-ATCC27543.....	31
9.3 Evaluación de la expresión de genes de virulencia en la clona SCV- ATCC27543.....	33
9.4 La clona SCV-ATCC27543 tiene el metabolismo modificado respecto a la cepa silvestre.....	35
9.5 La clona SCV-ATCC27543 de <i>S. aureus</i> es sobreproductora de biofilm.....	40
9.6 La clona SCV-ATCC2743 es resistente a los antimicrobianos.....	45
9.7 Persistencia de la clona SCV-ATCC27543 en CEMB.....	46
9.8 La clona SVC-ATCC27543 no induce apoptosis en las CEMB.....	47
10. DISCUSIÓN	51
11. CONCLUSIÓN	58

12. REFERENCIAS.....	59
----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de internalización de <i>Staphylococcus aureus</i> mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células fagocíticas no profesionales.....	5
Figura 2. Mecanismos que conducen al fenotipo de SCV en <i>Staphylococcus aureus</i> y su relación con la resistencia específica a las diferentes clases de antibióticos.....	7
Figura 3. Esquema del sistema Agr (azul) y de la familia de proteínas SarA (naranja).....	9
Figura 4. Generación de la clona SCV-ATCC27543.....	30
Figura 5. Prueba de estabilidad de la clona SCV de <i>S. aureus</i> ATCC27543.....	31
Figura 6. Caracterización de la clona SCV-ATCC27543.....	32
Figura 7. Expresión de genes de virulencia en la clona SCV-ATCC27543.....	34
Figura 8. Consumo de sustratos de carbono en placas de Biolog por la clona SCV-ATCC27543.....	39
Figura 9. Evaluación de la formación de biofilm en la clona SCV-ATCC27543.....	42
Figura 10. Evaluación de la formación de biofilm con sustratos únicos en la SCV-ATCC27543.....	44

Figura 11. Persistencia intracelular de la clona SCV-ATCC27543 en las CEMB47

Figura 12. Evasión de la apoptosis de las CEMB infectadas con la clona SCV-ATCC27543.....48

Figura 13. Mecanismo de persistencia de la clona SCV de *S. aureus* ATCC27543 en las CEMB57

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla1. Oligonucleótidos que fueron utilizados en este trabajo.....	24
Tabla 2. Antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana....	26
Tabla 3. Evaluación del uso de sustratos de carbono en la clona SCV-ATCC27543 en placas de Biolog	35
Tabla 4. Número de UFC recuperadas en Biofilm de la clona SCV-ATCC27543 en comparación con la cepa silvestre <i>S. aureus</i> ATCC27543.....	41
Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de la clona SCV-ATCC27543 en comparación con la cepa silvestre <i>S. aureus</i> ATCC27543.....	45

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agr	Gen regulador accesorio
AIP	Péptido auto inductor
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
CEMB	Células de epitelio mamario bovino
Cif A/B	Factor de aglutinación A/B
FAK	Cinasa de adhesión focal
Fnbp A/B	Proteína de unión a fibronectina
h	Horas
IL	Interleucina
LB	Caldo Luria Bertani
min	Minutos
MSCRAMM	Componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz
PBS	Buffer salino de fosfatos
SCVs	Variante de colonia pequeña (Del inglés Small Colony Variants)
TLR	Receptor tipo Toll

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram (+) asociada a enfermedades crónicas y persistentes tanto en la medicina humana (ej. osteomielitis) como en la veterinaria (ej. mastitis). Es el principal patógeno relacionado con la mastitis bovina subclínica (crónica y asintomática), enfermedad de gran importancia en la ganadería bovina lechera a nivel mundial. Esta bacteria es facultativa intracelular lo que le permite evadir la respuesta inmune del hospedero y la terapia antimicrobiana. Esto favorece la generación de variantes de colonia pequeña (SCVs) que presentan características distintas a la cepa silvestre (ej. crecimiento lento, auxotróficas, no hemolíticas). Las SCVs se asocian con la persistencia y cronicidad de diversas enfermedades en humanos, pero hasta el momento existen pocos estudios de SCVs de *S. aureus* asociados a mastitis bovina. El objetivo del trabajo fue generar y caracterizar una SCVs de *S. aureus* y evaluar su persistencia intracelular en células de epitelio mamario bovino (CEMB). Se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC27543 aislada de un caso de mastitis clínica y con capacidad de internalizar diferentes tipos celulares. Se generó una SCV estable utilizando gentamicina (1 µg/ml) como molécula inductora. Esta presentó un crecimiento lento (tiempo de generación de 523 min) con respecto a la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543 (tiempo de generación de 119 min), auxotrofia para menadiona y una disminución en la expresión de los genes de virulencia *agrA*, *RNAIII* y *fnbpA*. A través de ensayos de protección con gentamicina se observó que la SCV persistió intracelularmente en las CEMB aún a las 72 h, sin inducir apoptosis. En conclusión, se obtuvo una SCV de la cepa de *S. aureus* ATCC27543 que persiste intracelularmente sin afectar la viabilidad de las CEMB.

Palabras clave: Mastitis Bovina, *Staphylococcus aureus*, SCVs, Persistencia, Auxotrofia.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a Gram (+) bacterium associated with chronic and persistent diseases in human (eg. osteomyelitis), as well as in animals (eg. mastitis). It is the main pathogen related to subclinical bovine mastitis (chronic and asymptomatic), a disease of great importance in dairy cattle worldwide. This bacterium is facultative intracellular which allows it to evade the immune response of the host and the antimicrobial therapy. This stimulates the generation of small colony variants (SCVs) that have different characteristics to the wild strain (eg. slow growth, auxotrophy, non-hemolytic). The SCVs are associated with the persistence and chronicity of various diseases in humans; however, there are few studies of SCVs of *S. aureus* associated with bovine mastitis. The aim of this study was to generate and characterize a SCVs of *S. aureus* and to evaluate its intracellular persistence in bovine mammary epithelial cells (bMEC). We used the strain *S. aureus* ATCC27543 isolated from a case of clinical mastitis and capable of internalize different cell types. A stable SCV was generated using gentamicin (1 µg/ml) as a selection molecule. This clone showed a slow growth (generation time of 523 min) with respect to the wild strain *S. aureus* ATCC27543 (generation time of 119 min), menadione auxotrophy and a decrease in the expression of genes of virulence *AgrA*, *RNAIII* and *FnbpA*. By gentamicin protection assay, we observed that the SCV persisted intracellularly in the CEMB even at 72 h, without inducing apoptosis. In conclusion, a SCV was obtained from the strain of *S. aureus* ATCC27543 that persists intracellularly without affecting the viability of the bMEC.

1. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram (+) que se asocia con una amplia gama de enfermedades tanto en la medicina humana (ej. osteomielitis) como en la veterinaria (ej. mastitis). *S. aureus* es considerado un patógeno facultativo intracelular, lo cual le permite internalizarse y sobrevivir en fagocitos profesionales (macrófagos) (Buzzola *et al.*, 2007), y no profesionales (epitelio) (Almeida *et al.*, 1996), lo que le confiere la ventaja de evadir la respuesta inmune del hospedero, al mismo tiempo que disminuye la eficacia de la terapia antimicrobiana y favorece la presencia de enfermedades persistentes. Adicionalmente, algunas cepas de *S. aureus* tienen la capacidad de producir una subpoblación fenotípicamente diferente de la cepa silvestre, llamadas variantes de colonia pequeña (SCVs), las cuales son de lento crecimiento y poseen un menor tamaño que la cepa silvestre (1/10). Además, presentan una disminución del color dorado característico y de la hemólisis, la reacción de la coagulasa y catalasa son retardadas, y con frecuencia son auxotrófas para hemina, menadiona o timidina, los cuales son precursores esenciales de componentes de la cadena de transporte de electrones como el citocromo c o componentes de la menaquinona (Sendi y Proctor, 2009). Además, en comparación con la cepa silvestre, las SCVs son más resistentes a los antimicrobianos (ej. aminoglucósidos) (Vesga *et al.*, 1996; Sendi y Proctor, 2009).

S. aureus cuenta con diferentes reguladores de virulencia como el sistema Agr, responsable de la activación de exoproteínas y de la represión de proteínas de superficie (Gordon *et al.*, 2013). Otro regulador de virulencia importante es la familia de proteínas SarA, cuya activación o represión afecta la expresión de RNAlII, la cual es una molécula efectora de la virulencia de *S. aureus* ya que favorece la expresión de *agr*, y a su vez la expresión de proteínas de superficie (proteína A, ClfB y FnbpA) (Novick *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 2009). Por otro lado, sigma B es un factor esencial que permite el cambio de *S. aureus* de un fenotipo agresivo a un fenotipo silenciado (SCVs),

disminuyendo la expresión de *agr* y *sarA*, y como consecuencia la expresión de los factores de

virulencia y la producción de exotoxinas (Vestergaard *et al.*, 2016). Además, la sobreexpresión del factor sigma B induce la expresión de proteínas de adhesión lo que favorece una mayor producción de biofilm (Mitchell *et al.*, 2013). Todas estas características favorecen la supervivencia y persistencia del patógeno en condiciones bajas en nutrientes, estrés ambiental y le permite pasar desapercibido por el sistema inmune de la célula hospedera (Proctor *et al.*, 1998).

Una enfermedad crónica y persistente en la medicina veterinaria es la mastitis bovina subclínica. El principal patógeno asociado a ella es *S. aureus*, el cual se aísla en el 70% de los casos. Esta enfermedad se caracteriza por presentar una respuesta inflamatoria moderada en la glándula mamaria; sin embargo, la producción de la leche disminuye y aumenta el conteo de las células somáticas en la misma, por lo tanto es una enfermedad difícil de diagnosticar y es considerada como la enfermedad más costosa en las explotaciones lecheras (Kerro-Dego *et al.*, 2002).

Algunos autores han propuesto que la cronicidad de la mastitis bovina puede estar relacionada con la presencia de variantes de colonia pequeña o SCVs de *S. aureus* (Vesga *et al.*, 1996; Sendi y Proctor, 2009). No obstante, existen pocos estudios al respecto. Por ejemplo, se han recuperado SCVs de *S. aureus* a partir de casos de mastitis bovina crónica sometidas a tratamiento con gentamicina. Una característica de estas variantes fue su capacidad para internalizarse en células de endotelio de aorta bovina (Atalla *et al.*, 2008), y persistir a tiempos cortos (15 h) en células de epitelio mamario bovino (Zhu *et al.*, 2016). Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar una SCV de *S. aureus* ATCC27543 (cepa obtenida de un caso clínico de mastitis bovina subclínica) y evaluar su persistencia en las células de epitelio mamario bovino.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram (+), miembro de la familia Staphylococcaceae perteneciente al orden Bacillales, posee un diámetro de aproximadamente 0.8 micrómetros, es inmóvil, no forma esporas y es coagulasa positivo (Pahissa, 2009). Además, es un anaerobio facultativo intracelular lo que le permite sobrevivir e internalizarse en células fagocíticas no profesionales como células de endotelio, epitelio, fibroblastos y osteoblastos (Hirschhausen *et al.*, 2010). Presenta un genoma circular de 2,800 kb, contando con plásmidos donde residen algunos de los genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Lowy, 1998).

S. aureus es un patógeno comensal y altamente versátil que causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones crónicas como osteomielitis y endocarditis en humanos (Jarraud *et al.*, 2002). Es una bacteria causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales (Bustos *et al.*, 2006). En animales es causante de enfermedades como la mastitis bovina subclínica (López-Meza *et al.*, 2006).

2.2 Internalización de *Staphylococcus aureus* en células fagocíticas no profesionales

S. aureus se internaliza en fagocitos no profesionales (ej. células epiteliales mamarias bovinas, CEMB) por el mecanismo denominado “zipper”, para ello la bacteria requiere de la expresión de diferentes proteínas de superficie conocidas con el nombre de “componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz” (MSCRAMM) que le permiten adherirse a la superficie celular (Hauck *et al.*, 2006; Trouillet *et al.*, 2011). Estas proteínas son reconocidas por receptores en las células del hospedero, principalmente las integrinas, que se unen a fibrinógeno, fibronectina y colágeno. Entre las

MSCRAMM de *S. aureus* destacan los factores de aglutinación A y B (ClfA, ClfB) y las proteínas de unión a la fibronectina que son expresadas por los genes *fnbA* y *fnbB*; se considera que estas proteínas son un factor determinante para el establecimiento de la infección (Hoffmann *et al.*, 2011). El motivo RGD de la fibronectina es el sitio de unión a los receptores de integrinas. La activación y agrupamiento de la integrina $\alpha 5\beta 1$ desencadena rutas de señalización y la acumulación del complejo de proteínas de adhesión en las inmediaciones de la bacteria adherida, caracterizado por el reclutamiento de actina, paxilina, zyxina, tensina, la cinasa de adhesión focal (FAK) y la cinasa Scr (Figura 1). El paso crucial en estos eventos de señalización es la reorganización del citoesqueleto de actina. La cortactina es una proteína de unión a actina que ha sido identificada como uno de los efectores de activación de las cinasas FAK y Src, que se asocian con el complejo Arp2/3 para promover la polimerización de actina y unirse a dinamina-2, como un regulador de la endocitosis (Alva-Murillo *et al.*, 2014). Los MSCRAMM se producen principalmente en bacterias en fase de crecimiento logarítmico, lo que favorece la colonización de superficies (Pahissa, 2009). Sin embargo, se ha reportado que *S. aureus* puede utilizar otros mecanismos de internalización, donde puede interactuar con proteínas de choque térmico (Hsp) o con receptores tipo Toll (TLR2/TLR6) lo que permite mediar la endocitosis de la bacteria, aunque estos mecanismos no han sido descritos completamente (Alva-Murillo *et al.*, 2014).

2.3 Variantes de colonia pequeña en *S. aureus*

El control de *S. aureus* mediante la terapia antimicrobiana no es eficiente, además de que no existen vacunas adecuadas que protejan de la infección. Asimismo, la plasticidad genética de este patógeno ha facilitado la persistencia y la selección de cepas multi-resistentes a antibióticos que tienen gran impacto en la salud (Foster *et al.*, 2004). La persistencia de este patógeno se ha asociado a la habilidad de formar una población de crecimiento lento llamado “Variantes de Colonia Pequeña o SCVs” (por sus siglas en inglés Small Colony Variants) que

pueden sobrevivir en células fagocíticas profesionales y no profesionales, por lo que el estudio de las SCVs de *S. aureus* ha cobrado relevancia en los últimos años (Alexander *et al.*, 2001).

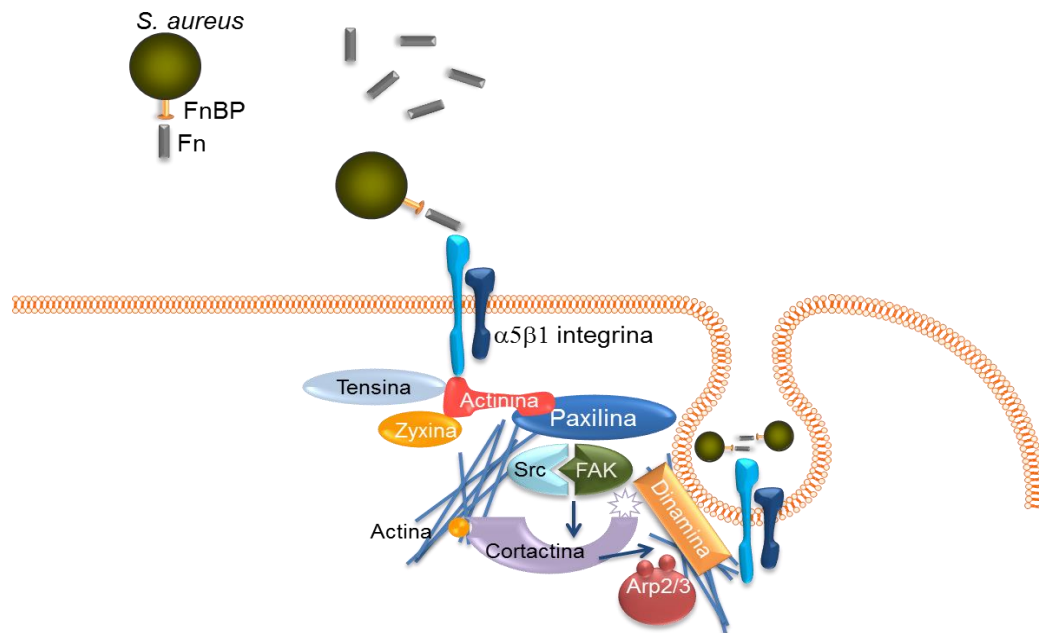


Figura 1. Mecanismo de internalización de *Staphylococcus aureus* mediada por la integrina $\alpha 5 \beta 1$ en células fagocíticas no profesionales. La bacteria expresa la proteína de unión a fibronectina (FnBP) que interactúa con el motivo RGD de la fibronectina (Fn), este sitio sirve de unión para los receptores de fibronectina, como las integrinas. La activación y agrupamiento de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ desencadena rutas de señalización y la acumulación del complejo de proteínas de adhesión en las inmediaciones de la bacteria adherida, caracterizado por el reclutamiento de actina, paxilina, zyxina, tensina, cinasa de adhesión focal (FAK), y la cinasa Src. El paso crucial en estos eventos de señalización es la reorganización del citoesqueleto de actina. La cortactina es una proteína de unión a actina que ha sido identificada como uno de los efectores de activación de cinasas FAK y Src, que se asocian con el complejo ARP2/3 para promover la polimerización de actina y unirse a dinamina-2, como regulador de la endocitosis (Tomado de Alva-Murillo *et al.*, 2014).

Las SCVs son aisladas con frecuencia a partir de infecciones crónicas y recurrentes (Schröder *et al.*, 2006; Vesga *et al.*, 1996). Estas SCVs tienen características fisiológicas diferentes comparadas a las presentes en las cepas silvestres de *S. aureus*, ya que presentan una reducción en la producción de alfa toxina, poseen una actividad de coagulasa retardada, una reducción en la pigmentación y hemólisis, además poseen mutaciones en genes asociados con algunas rutas biosintéticas como la producción de menadiona y/o hemina, adicionalmente se han encontrado otras mutaciones como en el citocromo c (CtaA) y el auxotrofismo a timidina (Figura 2) (Clements *et al.*, 1999).

La auxotrofia para hemina que presentan las SCVs puede ser ocasionada por la eliminación del gen *hemH* y el cambio del marco de lectura de *hemA*, ambos genes están involucrados en la biosíntesis de hemina (Schaaff *et al.*, 2003). La auxotrofia para menadiona es causada por la mutación del gen *menB*, este gen codifica a la enzima naftoato sintasa, una enzima que es parte de la superfamilia de las crotonasas, cuya función es convertir el o-succinilbenzoil coenzima A a 1, 4-dihidroxi-2-naftoato más coenzima A (Lannergård *et al.*, 2008). Los defectos en la biosíntesis de hemina o menadiona interrumpen la actividad funcional de la cadena de transporte de electrones debido a que hay una pérdida del grupo prostético en los citocromos, lo que conduce a una disminución del potencial de membrana y a la reducción de la producción de ATP, dando como consecuencia una baja síntesis de proteínas, carotenoides (no hay pigmentos), pared celular y una tasa disminuida de crecimiento (Garcia *et al.*, 2013). Adicionalmente, la pérdida de la biosíntesis de hemina impacta en la producción de catalasa en *S. aureus* (Pader *et al.*, 2014; Proctor *et al.*, 2014).

En pacientes con fibrosis cística se han encontrado SCVs con mutaciones que derivan en auxotrofismo a timidina, y estas interfieren con la ruta del ácido tetrahidrofolato. La enzima timidilato sintetasa (*thyA*) requiere ácido tetrahidrofólico como cofactor para catalizar el último paso de la ruta de biosíntesis *de novo* del timidilato, que es esencial para la síntesis de ADN y la replicación bacteriana, responsable para la formación de desoxitimina monofosfato (dTMP) (Melter *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2016). También se ha reportado una mutación en el gen *thyA* que

altera el ciclo de Krebs al disminuir la abundancia de la enzima aconitasa (citB) que cataliza la isomerización estereoespecífica de citrato a isocitrato a través de *cis*-aconitato. De este modo, la mutación de *thyA* es una posible explicación para la auxotrofia para timidina y el cambio al fenotipo de SCV (Chatterjee *et al.*, 2007; Kriegeskorte *et al.*, 2014).

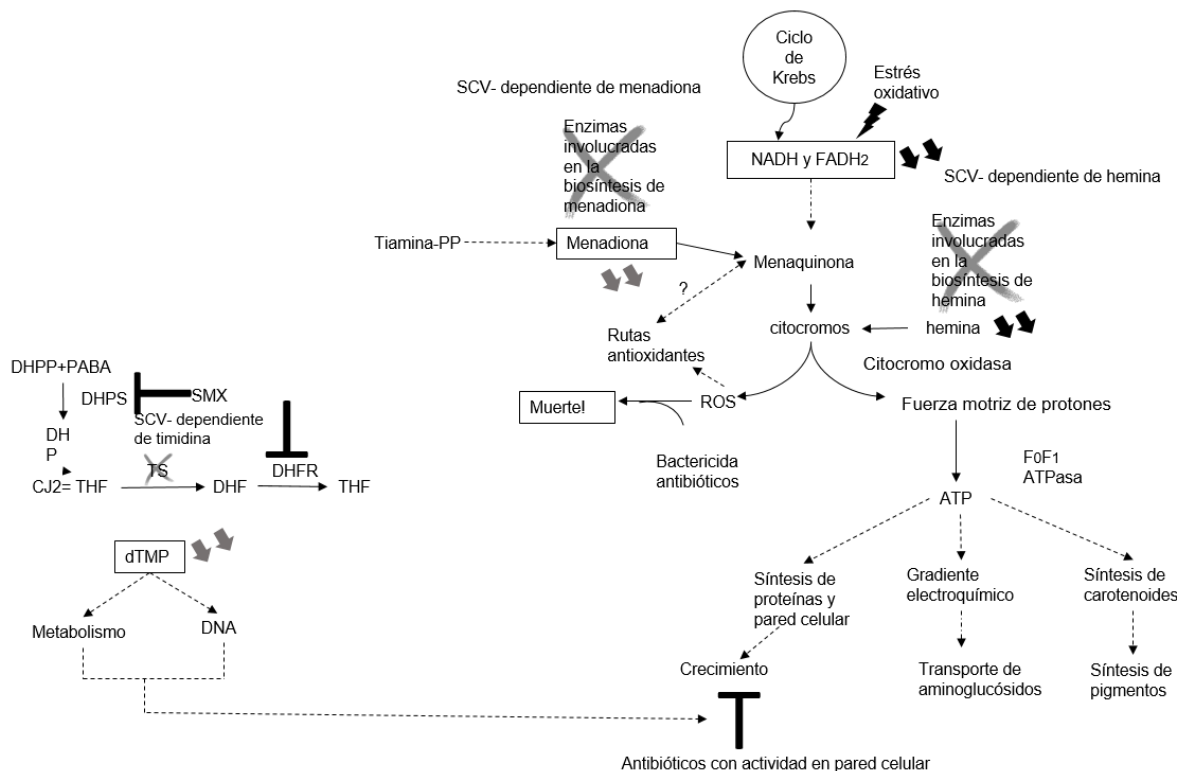


Figura 2. Mecanismos que conducen al fenotipo SCV en *Staphylococcus aureus* y su relación con la resistencia específica a diferentes clases de antibióticos. Las flechas dobles se refieren a metabolitos cuyas concentraciones son reducidas en el fenotipo de SCV. Las SCVs deficientes en la cadena transportadora de electrones muestran alteraciones en las rutas que conducen a la síntesis de menadiona o hemina (subsecuentemente a mutaciones en enzimas biosintéticas), las cuales causan una reducción en la acumulación de ATP producido. Esto provoca una reducida tasa de crecimiento, que puede afectar la eficacia de los antibióticos cuyo blanco de acción es la división de la pared bacteriana. La reducción en el potencial transmembranal deteriora el ingreso de los aminoglucósidos. Las SCVs dependientes de menadiona son susceptibles a las especies oxidantes, posiblemente atribuido al transporte reducido de electrones y a la alteración de la inducción de las vías antioxidantes. Los SCVs

dependientes de timidina no pueden convertir el dUMP en dTMP (usando dihidrofolato (DHF) como cofactor) debido a mutaciones en la timidato sintasa (TS), llevando al agotamiento de dTMP. Estas clonas no son susceptibles a los agentes antifolatos que actúan sobre pasos de esta ruta, llamadas sulfamidas como el sulfametoxazol (SMX) (inhibidores de la dihidropteroato sintasa (DHPs) produciendo dihidropteroato (DHP) del pirofosfato de Dihidropteridina (DHPP) y el ácido para aminobenzoico (PABA)), y a diaminopiridinas, por ejemplo, trimetoprima (TMP) (inhibidores de la dihidrofolato (THF)) (Modificada de Garcia *et al.*, 2013).

2.4 Factores de virulencia en *S. aureus* y en variantes de colonia pequeña

La capacidad de *S. aureus* para provocar diversas infecciones está relacionada con la presencia de diferentes factores de virulencia y moléculas que permiten la evasión del sistema inmune (Zecconi *et al.*, 2013). La expresión de los factores de virulencia está controlada de una manera temporal y es dependiente de la densidad celular, además de ser afectada de manera multifactorial por los sistemas reguladores globales. *S. aureus* tiene el regulador de virulencia *agr* (gen regulador accesorio) involucrado en el *quorum-sensing* (Novick, 2003). El locus *agr* posee dos promotores divergentes: P2 que transcribe a RNAII, y P3 que transcribe a RNAIII. P2 controla la expresión del operón *agrABCD* que regula la activación del circuito *agr* del *quorum sensing* (Figura 3). Específicamente, *agrD* codifica la molécula del péptido auto inducible (AIP) que es procesada y secretada por *agrB*. AgrA y AgrC constituyen dos componentes de señalización del sistema, que detectan AIP y completan el sistema de *quorum sensing* Agr. La secreción de AIP permite su unión al receptor de señal de unión transmembranal a quinasa AgrC y lo activa, subsecuentemente se somete a una transautofosforilación y transfiere el fosfato a AgrA, que es el regulador de la respuesta. La proteína AgrA fosforilada activa al promotor P2, de tal modo que completa la autoinducción de la activación del circuito. AgrA regula el sistema *quorum-sensing* a través del promotor P2; además, regula el promotor P3 que transcribe a RNAIII, la molécula efectora del sistema Agr. RNAIII inhibe la expresión de proteínas de superficie, genes y promotores de la expresión de la exotoxina hemolítica (Novick *et al.*, 1993; Pader *et al.*, 2014; Vuong *et al.*, 2000).

En las SCVs el sistema *quorum-sensing* está disminuido debido a que la densidad de crecimiento no es suficiente para activar el sistema Agr, además RNAIII está ausente; ésto es interesante porque *S. aureus* expresa RNAIII de manera basal en la fase de crecimiento exponencial (Proctor *et al.*, 2006). RNAIII regula la producción de toxinas y proteasas y regula negativamente las adhesinas; por lo que en las SCVs existe una disminución en la producción de toxinas y hemolisinas (Gordon *et al.*, 2013; Kahl *et al.*, 2014). Sin embargo, en algunas SCVs las proteínas de unión a fibronectina (FnBP) se ven sobreexpresadas, siendo esto de manera independiente al sistema Agr (Vaudaux *et al.*, 2002). De manera que, en las SCVs que tienen disminuido el sistema Agr, se ve potencializado el factor sigma B (SigB) que resulta en una fuerte expresión de proteínas de superficie y en la ausencia de la producción de citolisinas (Novick, 2003; Painter *et al.*, 2015). Además, SigB está asociado con la baja densidad de crecimiento de las SCVs y un incremento en la formación de biofilm con respecto a las cepas silvestres de *S. aureus* (Tuchscherer *et al.*, 2015).

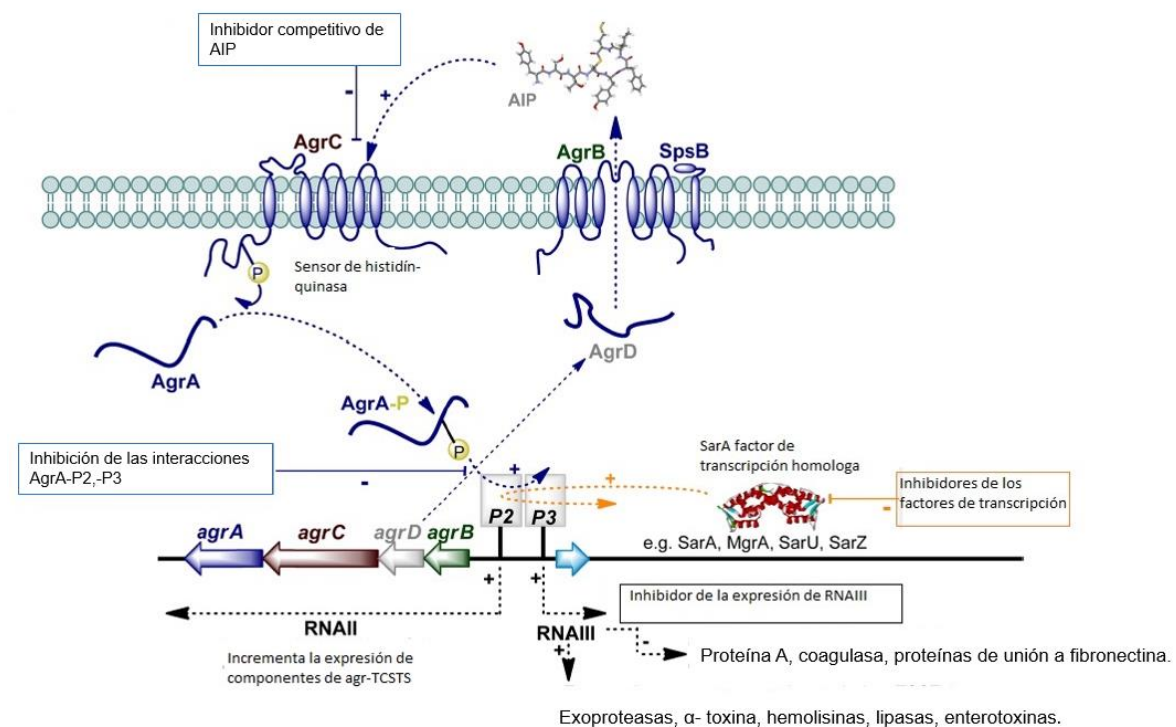


Figura 3. Esquema del sistema Agr (azul) y de la familia de proteínas SarA (naranja). El locus *agr* está constituido por dos componentes de transcripción divergente llamados RNAII y RNAIII, cuya transcripción depende de los

promotores P2 y P3, respectivamente. RNAII forma parte de un operón de cuatro genes, *agrBDCA*. *agrD* es el precursor del péptido autoinductor (AIP), que es procesado y exportado a través de AgrB, éste tiene funciones catalíticas como una cisteín-endopeptidasa para generar un intermediario acil AgrB-AgrD, que sufre una trans-tioesterificación resultando en la liberación/regeneración de AgrB. En la concentración umbral, AIP se une al receptor AgrC que está unido a la membrana con un sensor histidina cinasa. La unión de AIP activa la cinasa AgrC, resultando en una fosforilación del regulador de respuesta AgrA y la activación de los promotores P2 y P3. La familia de proteínas SarA abarca al menos 10 reguladores transcripcionales que inician cascadas de complejos moleculares que regulan la expresión de numerosos sistemas de virulencia. La activación o represión en última instancia afecta la expresión de ARNIII y se considera una molécula efectora de la virulencia de *S. aureus* (Modificado de Gordon *et al.*, 2013).

El fenotipo SCV es inestable, por lo que en algunas cepas este puede revertir con frecuencia al fenotipo normal (Baumert *et al.*, 2002). Las SCVs de *S. aureus* pueden estar particularmente relacionadas con la persistencia, supervivencia y resistencia en células hospederas. Se ha demostrado que las SCVs pueden sobrevivir en células fagocíticas profesionales y no profesionales (Alexander *et al.*, 2001). Además estas variantes son de difícil tratamiento con antibióticos convencionales, ya que se ha encontrado que las SCVs presentan de 8 a 16 veces más resistencia a los aminoglucósidos (ej. estreptomicina, kanamicina y gentamicina) respecto a la cepa silvestre (Neut *et al.*, 2007). Esto se ha atribuido a que las SCVs presentan un desacoplamiento en la cadena respiratoria que reduce el ingreso de estos fármacos a las células bacterianas, ya que éste ocurre a través del transporte activo, el cual es dependiente del potencial de membrana. Además, las SCVs tienen afectada la enzima catalasa lo que interfiere con el metabolismo oxidativo y la absorción de los aminoglucósidos (Taber *et al.*, 1987; Vestergaard *et al.*, 2016). Aunado a lo anterior, el bajo crecimiento de las SCVs, y por consiguiente una baja síntesis de la pared celular, reduce la eficacia de los fármacos que actúan a nivel de pared celular como las penicilinas y cefalosporinas (Looney, 2000).

2.5 Infecciones causadas por SCVs de *S. aureus*

La subpoblación de crecimiento lento de *S. aureus* (SCVs) se ha reportado desde hace poco más de 100 años, pero no habían sido objeto de estudio debido a que no son fácilmente detectadas por los análisis de laboratorio convencionales (Johns *et al.*, 2015; von Eiff *et al.*, 2006). En años recientes las SCVs de *S. aureus* han cobrado relevancia debido a que se han relacionado con la habilidad de persistir intracelularmente, siendo recuperadas de pacientes con condiciones predisponentes como osteomielitis y fibrosis quística, observándose el mismo fenotipo y una reincidencia de la enfermedad, aún con el tratamiento antimicrobiano adecuado (Harris *et al.*, 2006; von Eiff *et al.*, 2006). En este mismo sentido, las SCVs pueden ser recuperadas de infecciones en la piel, endocarditis, artritis séptica, todas estas enfermedades tienen la característica de ser crónicas y ser tratadas con aminoglucósidos para su control (Bhattacharyya *et al.*, 2012; Gläser *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, las SCVs se han relacionado también con enfermedades crónicas en animales como la mastitis bovina, la cual es una enfermedad persistente y de difícil tratamiento, principalmente causada por *S. aureus* (Atalla *et al.*, 2008). Sin embargo, los estudios aún son incipientes y existen pocos reportes donde se asocian las SCVs con esta enfermedad. Adicionalmente, no existen reportes donde se evalúe si la formación de biofilm favorece la persistencia de la enfermedad en bovinos, por lo que resulta relevante el estudio de este mecanismo.

2.6 Mastitis bovina

La mastitis bovina es una de las enfermedades más costosas dentro del sector ganadero ya que afecta la salud del animal, reduciendo la cantidad y calidad de la leche (Millogo, 2010). La mastitis bovina puede ser de origen infeccioso o traumático, principalmente se presenta en la etapa de lactancia y durante el periodo seco. La mayoría de las infecciones se generan cuando los microorganismos cruzan las barreras físicas del canal de pezón. Una vez dentro de la cisterna del pezón, los microorganismos se multiplican y se establecen en el

tejido de la glándula mamaria (ej. epitelio y endotelio) si la respuesta inmune innata es insuficiente (Kerro Deogo *et al.*, 2002).

La mastitis bovina, de acuerdo a los signos, se puede clasificar en clínica y subclínica (Ferraro *et al.*, 1999). La mastitis clínica se presenta en forma aguda o crónica; en la etapa aguda se observa una ubre enrojecida, hinchada y con dolor, además de una disminución de la producción de leche; la forma crónica se manifiesta por cambios morfológicos como el aumento del tejido glandular y en la palpación (Aitken *et al.*, 2011). La mastitis subclínica no presenta signos visibles (inflamación en la ubre); sin embargo, disminuye la producción de la leche y el conteo de células somáticas se encuentra elevado (mayor a 200 mil células somáticas). En la mastitis subclínica el principal patógeno aislado es *S. aureus* (López Meza *et al.*, 2006). Se ha reportado que esta bacteria se internaliza en las células del epitelio mamario bovino (CEMB) confiriendo cronicidad a la enfermedad, lo que favorece que la bacteria evada la terapia microbiana y el sistema inmune de la vaca. Se considera que de los casos de mastitis bovina que se presentan en los hatos, los antibióticos solo pueden curar un 20%-70% en el periodo seco de la vaca y un 10-30% de los casos en periodo de lactación (Kerro Deogo *et al.*, 2002).

2.7 Respuesta inmune innata de las CEMB durante la infección por *S. aureus* silvestre y SCVs

La principal función del sistema inmune es el proteger al hospedero de agentes que provocan daño como infecciones causadas por una diversidad de patógenos, en vertebrados éste se divide en sistema inmune adaptativo y sistema inmune innato. El sistema inmune adaptativo es caracterizado por la producción de anticuerpos al reconocer antígenos propios del patógeno, generando especificidad; aunque esta respuesta es generada después de días del evento de infección. Para que se presente una respuesta inmune adaptativa se requiere la activación de la respuesta inmune innata (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro, 2001; Quintin *et al.*, 2014). La respuesta inmune innata es una respuesta rápida ante el reconocimiento de un patógeno, éste se presenta por receptores de

reconocimiento de patógenos (PRR) presentes en las células del hospedero (ej. Receptores Tipo Toll (TLRs)), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos patrones constituyen un conjunto de moléculas conservadas y compartidas por una gran variedad de microorganismos y pueden estar presentes en la superficie (Pereyra *et al.*, 2014).

Específicamente los componentes de la respuesta inmune innata en la glándula mamaria bovina incluyen barreras físicas, como el esfínter del pezón; barreras químicas, como la queratina del canal del pezón; factores solubles como la lactoferrina, lisozima, proteínas del complemento, citocinas y quimiocinas. Además, participan células fagocíticas profesionales como neutrófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (NK), y células fagocíticas no profesionales como los fibroblastos, el endotelio y CEMB (Rainard y Riollet, 2006; Zecconi *et al.*, 2013).

En el caso de la mastitis bovina, las CEMB juegan un papel importante en la respuesta inmune innata al reconocer a *S. aureus* a través de receptores tipo Toll, particularmente TLR2, esto conduce a un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), de quimiocinas como interleucina 8 (IL-8) y RANTES (quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T) para atraer neutrófilos al sitio de infección, y como resultado, favorecer el proceso inflamatorio (Nishimura *et al.*, 2003; Oviedo-Boyso *et al.*, 2007; Magro *et al.*, 2017). Aunado a esto se pueden producir también citocinas anti-inflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) para regular el daño tisular (Alva-Murillo *et al.*, 2014). Aunque también se producen otros moduladores de la inmunidad innata como los péptidos antimicrobianos (ej. péptido antimicrobiano traqueal, péptido antimicrobiano lingual), que pueden atacar al patógeno cuando se encuentra fuera de la célula o en el endosoma formado tras la fagocitosis por parte de la célula hospedera (Tomasinsig *et al.*, 2010; Alva-Murillo *et al.*, 2013).

En las CEMB se ha demostrado que *S. aureus* puede inhibir la respuesta inmune innata al apagar factores transcripcionales involucrados en la misma como NF- κ B, E2F-1, EGR o MEF-1 (Alva-Murillo *et al.*, 2015). Sin embargo, se

encuentra activado el factor AP-1 lo que se relaciona con la expresión de los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos TAP, LAP, BNBD5, BNBD4; además se encuentra disminuida la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 e IL-1 β e inducida la expresión de IL-10 y TNF- α , promoviendo un estado antiinflamatorio en las CEMB, lo cual pudiera favorecer el establecimiento de infecciones crónicas (Alva-Murillo *et al.*, 2015; Alva-Murillo *et al.*, 2017).

Respecto a las SCVs de *S. aureus*, no se han realizado estudios donde se evalúe la regulación que ejercen sobre la respuesta inmune innata en las CEMB. Sin embargo, se ha evaluado el efecto de la SCV WCH-SK2 sobre la respuesta inmune innata en células humanas de epitelio de pulmón NuLi-1 comparada con la infección de la cepa silvestre WCH-SK2. La infección por la cepa silvestre induce un perfil pro-inflamatorio (IL-1 β , IL-6 e IL-12), además de activar factores de remodelación de tejidos y la inducción del ARNm de TLR2, a diferencia de la SCV que solo induce la sobre expresión de TLR2 (Ou *et al.*, 2016).

2.8 *S. aureus* induce apoptosis en las CEMB

La apoptosis, o también llamada muerte celular programada, es un proceso genético y bioquímico, en el cual se regula la morfogénesis, la defensa del hospedero y la homeostasis en todos los tejidos (Sun *et al.*, 1999). Las caspasas son una familia de cisteínproteasas que median la apoptosis que puede ser inducida por varios estímulos (Lamkanfi *et al.*, 2002). Se han descrito dos rutas de apoptosis donde se encuentran involucradas las caspasas: la vía intrínseca y la vía extrínseca.

La vía intrínseca involucra la liberación del citocromo C de la mitocondria, que interactúa con Apaf-1 y dATP para promover la auto activación de la pro caspasa-9, activando efectores como las caspasa 3, 6 y 7, esta vía usualmente es desencadenada por señales de estrés, daño al ADN y niveles altos de especies reactivas de oxígeno (Ricci y Zong, 2006). La vía extrínseca inicia por la unión de un ligando a receptores de la superficie celular (CD95/FAS/APO-1/TNF). El complejo de receptores y ligandos reclutan moléculas adaptadoras como Fas-

dominio asociado a muerte (FADD) y activan a la caspasa 8 (Yin *et al.*, 2000). En algunas células la activación de la caspasa 8 es suficiente para activar directamente la caspasa 3, mientras que en otras células la caspasa 8 indirectamente media la activación de la caspasa 3 a través de la unión de Bcl2, un miembro de la familia Bid, lo que induce la liberación del citocromo C de la mitocondria, ligándose así la apoptosis extrínseca con la intrínseca (Labbé y Saleh, 2011). Después de la activación, las caspasas se adhieren a varios sustratos celulares (ej. PARP), dando como resultado protuberancias en la membrana, condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos (Ricci y Zong, 2006).

Se ha reportado que la infección provocada por *S. aureus* en las CEMB puede activar la apoptosis, ésta es inducida por el daño que este patógeno produce en la glándula mamaria. Para la activación de la apoptosis en las CEMB por *S. aureus* es necesaria la sobrerregulación de Fas y FADD, sucesivamente se activa la caspasa 8 y caspasa 3, dando como resultado la liberación de citocromo C de la mitocondria al citoplasma (Andreotti *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2014). Respecto al efecto de las SCV sobre la apoptosis en las CEMB, existe un reporte de un caso crónico de mastitis bovina donde se aislaron dos cepas de *S. aureus*, una de ellas con fenotipo de SCV. Cuando se infectó con esta SCV un cultivo primario de CEMB y se evaluó la inducción de apoptosis, se encontró que la SCV disminuye la apoptosis en un 30% en las CEMB, respecto a la apoptosis inducida por la cepa silvestre (Zhu *et al.*, 2016). Este es el único estudio hasta el momento donde se evalúa la inducción de apoptosis en las CEMB bajo la infección de una SCV.

3. ANTECEDENTES

Las SCVs de *S. aureus* se han asociado directamente con la mastitis bovina subclínica; no obstante, los estudios realizados al respecto son pocos. En un estudio experimental donde se analizaron 11 muestras de leche con mastitis bovina crónica, se identificaron SCVs después de 48 h de incubación de las muestras en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de oveja. A partir de estos resultados los autores asocian a las SCVs con la persistencia de la mastitis bovina, y con el uso de gentamicina como herramienta terapéutica (Atalla *et al.*, 2008). Posteriormente, el mismo grupo de trabajo demostró la capacidad de las SCVs para persistir intracelularmente debido a que no son percibidas por el sistema inmune de la vaca, ya que no fueron detectadas por los anticuerpos IgG1 e IgG2, ésto se relacionó con la capacidad de las SCVs para reprimir la expresión de exoproteínas y toxinas (Atalla *et al.*, 2010). Por otro lado, se reportó que a tiempos tempranos de la infección, las SCVs pasan desapercibidas por el sistema inmune del bovino, ya que hasta el día 21 después de la infección se detectó en suero de leche la presencia de la citocina IL-8, IFN- γ y TGF- β , lo cual favorece la persistencia intracelular de las SCVs (Kim *et al.*, 2011).

En otro estudio en leche de bovinos se aislaron dos cepas de *S. aureus* que generaban SCVs, con las cuales se realizaron ensayos de persistencia a las 0.5, 3, 9 y 12 h, interesantemente los autores reportaron la recuperación de UFC de SCVs después de eliminar las bacterias que no internalizaron con lisostafina; además, midieron la inducción de apoptosis y encontraron que las SCVs disminuyen la apoptosis en un 30% en las CEMB respecto a la inducida por la cepa silvestre (Zhu *et al.*, 2016).

Buscando alternativas para eliminar la infección por *S. aureus*, Coté- Gravel y colaboradores (2016) generaron una doble mutante de *S. aureus* en los genes *hemB* y *vraG* dando lugar a una SCV. Al administrar esta doble mutante de manera subcutánea a ratones, encontraron que se puede inmunizar en contra de infecciones intramamarias causadas por *S. aureus* de diferentes cepas, observándose un incremento en las IgG que permitía una detección más rápida de la infección y la resistencia a dosis letales con cepas más virulentas de *S. aureus*.

Sin embargo, aún no se han hecho estudios similares en glándula mamaria de vacas; además, como efecto secundario de la vacuna se observó una inflamación en el lugar de la inyección (Coté- Gravel *et al.*, 2016).

Dentro de nuestro grupo de trabajo se han evaluado diversas moléculas inmunoregulatoras como posible tratamiento para la mastitis bovina, entre ellas ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que puedan ayudar a la eliminación de *S. aureus*. En el caso del AGCC butirato de sodio (0.5 mM), éste disminuyó la internalización (~50%) de *S. aureus* ATCC27543 en las CEMB, y actúa como un inmunomodulador al favorecer la expresión del gen del péptido antimicrobiano traqueal (Ochoa-Zarzosa *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados indican que a pesar de que los AGCC inhiben la internalización de *S. aureus* en las CEMB, algunas de las colonias recuperadas mostraron una similitud con el fenotipo de SCVs; pero no se han realizado estudios que confirmen dicha información, y también se desconoce si estas persisten intracelularmente en dichas células. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar y caracterizar una SCV de la cepa ATCC27543 de *S. aureus* y evaluar su persistencia intracelular en las CEMB.

4. JUSTIFICACIÓN

Las SCVs de *S. aureus* se asocian con infecciones crónicas recurrentes en pacientes con tratamiento antimicrobiano convencional (Sendi y Proctor, 2009), por lo que es de interés el estudio de estas variantes fenotípicas. Además, estas SCVs tienen la capacidad de disminuir la producción de α -toxina, logrando pasar desapercibidas por el sistema inmune del hospedero, favoreciendo la formación de un biofilm más robusto, presentando una actividad disminuida del sistema Agr e incrementando la expresión del factor sigma B, lo que se traduce en una fuerte expresión de proteínas de superficie y una disminución en citolisinas (Kahl *et al.*, 2014). Lo anterior podría ser una estrategia bacteriana para persistir en el interior de la célula hospedera, dando origen a infecciones crónicas y de difícil manejo. Adicionalmente, estas SCVs tienen una alta resistencia a antibióticos, principalmente a los aminoglucósidos como la gentamicina, que son empleados comúnmente para el tratamiento de la mastitis bovina (Painter *et al.*, 2015).

En el caso de los bovinos existen pocos reportes que asocian a las SCVs de *S. aureus* con la mastitis crónica y recurrente. Por lo cual es importante caracterizar una SCV generada a partir de la cepa *S. aureus* ATCC27543 aislada de un caso clínico de mastitis bovina; además de evaluar *in vitro* su persistencia intracelular en las CEMB.

5. HIPÓTESIS

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC27543 produce variantes de colonia pequeña, las cuales persisten intracelularmente en células de epitelio mamario bovino.

6. OBJETIVOS

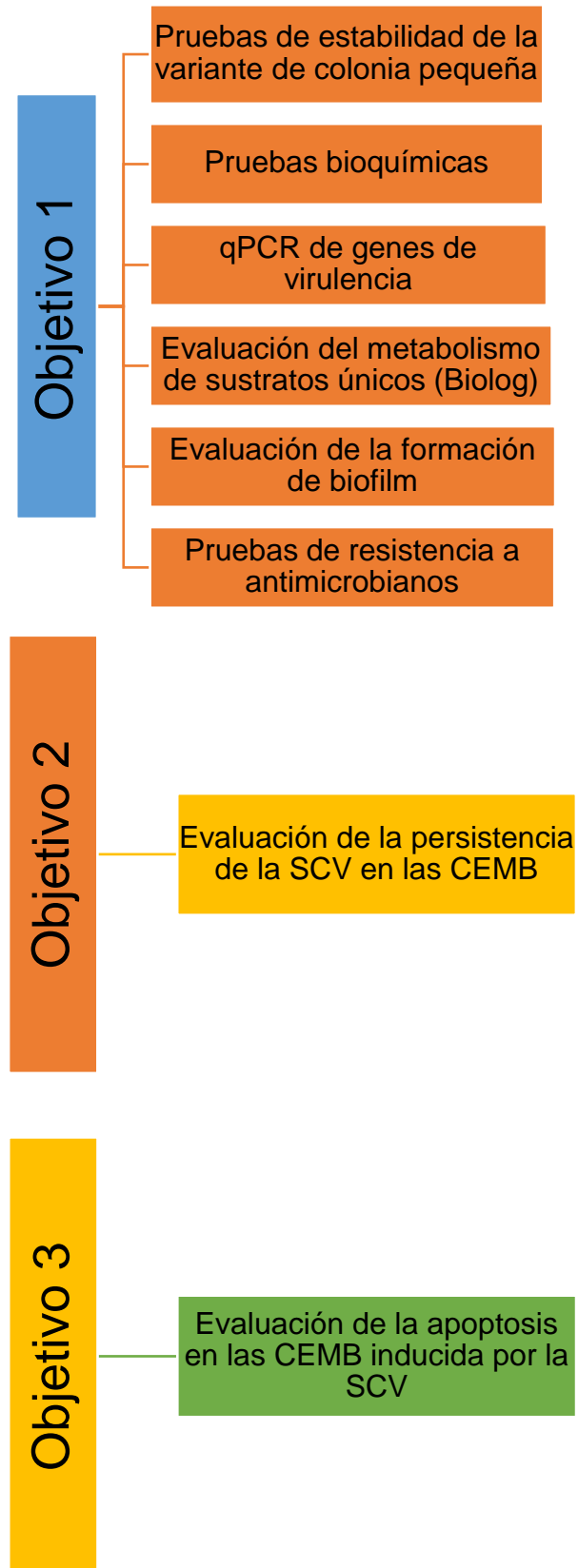
6.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar una variante de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus* ATCC27543, y evaluar su persistencia intracelular en células de epitelio mamario bovino.

6.2 Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar una variante de colonia pequeña de *Staphylococcus aureus* ATCC27543.
2. Evaluar la persistencia intracelular de la variante de colonia pequeña de *S. aureus* ATCC27543 en las células de epitelio mamario bovino.
3. Evaluar la inducción de apoptosis en las células de epitelio mamario causada por la infección de la variante de colonia pequeña de *S. aureus* SCV-ATCC27543.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Reactivos y cepas

Se utilizó una cepa certificada de *S. aureus* ATCC27543 con la capacidad de internalizar en epitelio y endotelio bovino (Gutiérrez-Barroso *et al.*, 2008). La variante SCV de esta cepa se generó utilizando una concentración subinhibitoria (1 µg/ml) de gentamicina (AMSA), este antibiótico es utilizado en el tratamiento de la mastitis bovina (De Oliveira *et al.*, 2000; du Preez *et al.*, 2000).

8.2 Inducción de variantes de colonia pequeña

Se preparó caldo soya tripticaseína (BD Bioxon) con gentamicina (1 µg/ml). En 50 ml de caldo se inoculó una colonia de *S. aureus* ATCC27543 y se cultivó a 37°C a 180 rpm por 24 h. Posteriormente se tomaron 20 µl del cultivo bacteriano y se inocularon en otros 50 ml de caldo con antibiótico, y se creció a 37°C a 180 rpm por 24 h. Después, se distribuyeron alícuotas (200 µl) del cultivo en cajas de agar sangre y agar soya tripticaseína (BD Bioxon), suplementados con 1 µg/ml de gentamicina. Las posibles SCVs se identificaron realizando subcultivos en agar sangre evaluando su estabilidad fenotípica.

8.3 Pruebas de estabilidad de las variantes de colonias pequeñas

Se realizaron cinéticas de crecimiento de la SCV en caldo infusión cerebro corazón (Becton Dickinson) sin gentamicina. Para ello, se inoculó una colonia en 25 ml de caldo y se crecieron a 37°C a 180 rpm. El tiempo de generación de las posibles variantes y de la cepa silvestre se determinó midiendo la DO a 595 nm en un espectrofotómetro (Bio Rad iMark) cada 4 h por 24 h y usando la siguiente formula: $Gt = t/3.3 \lg(b/B)$, donde t: tiempo (min), b: densidad óptica, B: densidad óptica inicial.

8.4 Pruebas de identificación de las variantes de colonias pequeñas

Las pruebas bioquímicas para la identificación de la SCV (actividad hemolítica, fermentación de manitol) se realizaron de la siguiente manera:

Actividad hemolítica: La medición se realizó directamente en cajas de agar sangre preparadas con base de agar sangre (BD Bioxon), suplementado con 5% de sangre de cordero. Las cajas se inocularon estriando el cultivo de la clona SCVs-ATCC27543 en medio soya tripticaseína con 1 µg/ml de gentamicina por 24 h a 37°C. Se utilizó como control a *S. aureus* ATCC27543 cultivado en cajas con medio LB durante toda la noche y se incubaron por 24, 48 y 72 h a 37°C. Posteriormente se observó el radio de hemólisis directamente en la caja de agar sangre, determinando la presencia o ausencia del halo de hemólisis.

Fermentación de manitol: Se distribuyó una colonia de las posibles SVC en cajas de agar sal y manitol (BD BIOXON), las cuales se incubaron a 37°C por 24, 48 y 72 h. Después de estos tiempos se observó el cambio de coloración del agar. Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color. Los estafilococos que no fermentan el manitol se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

Pruebas de auxotrofismo: Se prepararon cajas de agar soya tripticaseína suplementadas con menadiona (10 µg/l) o timidina (100 µg/l). Para las evaluaciones se inoculó en las cajas una colonia de las posibles SCVs, y luego se incubaron a 37°C por 24, 48 y 72 h. Al final de los tiempos de incubación se observó la reversión del fenotipo SCV al de la cepa silvestre.

8.5 Extracción de ARN y análisis de la expresión de genes de virulencia de *S. aureus*

Para la evaluación de la expresión de genes de virulencia se realizó una extracción del ARN total de la clona SCV y la cepa silvestre. En el caso de la cepa silvestre las extracciones se realizaron a las 2 y 24 h de cultivo. Para la clona SCV, las extracciones fueron a 24 y 48 h. Estos tiempos corresponden a la fase exponencial y estacionaria de crecimiento, respectivamente. La extracción de ARN total se realizó con Trizol de acuerdo con las indicaciones del proveedor (TRIZOL Reagent, Life Technologies). La síntesis de ADNc se realizó con el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) utilizando “random primers” (hexámeros,

Invitrogen). Se realizó la amplificación de los genes *16S* y *nuc* por PCR en punto final para corroborar la integridad de ADNc y verificar que éste perteneciera a *S. aureus*. Los niveles de expresión de genes reguladores y de factores de virulencia de *S. aureus* se establecieron mediante qPCR a través del método comparativo ($\Delta\Delta C_t$) en un termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con el kit Master Mix USB VeriQuest (Affimetrix). Se utilizó el gen *16S* como control endógeno. Las características de los oligonucleótidos específicos utilizados en este estudio son mostradas en la tabla 1.

Tabla1. Oligonucleótidos que fueron utilizados en este trabajo.

Primer	Secuencia 5´-3´	Tm	Tamaño del amplicon (pb)	Referencias
16S	D TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG			Klein <i>et al.</i> , 2012
	R TCATCGTTTACGGCGTGGACTACC	50°C	260	
RNAIII	D GCATTTATTGGGGCATTGTATT			Este estudio
	R GTGCCGGTCCCTCTTCTTTTAT	55°C	196	
AgrA	D TGCGAAGACGATCCAAAACAA			Este estudio
	R CCAACTGGGTCATGCTTACGAA	60°C	203	
FnbpA	D CGACACACCTCAAGACAATAGCGG			Este estudio
	R TGTGGCTTACTTTCTGATGCCGTTT	59°C	192	
Nuc	D GACTATTATTGGTTGATCCACC			Brakstad <i>et al.</i> , 1992
	R GCCTTGSCGAACTAAAGCTTCG	54°C	267	

8.6 Evaluación del metabolismo de sustratos únicos (Biolog)

La clona SCV se cultivó en cajas de agar soya tripticaseína con 1 µg/ml de gentamicina por 24 h a 37°C. Se utilizó como control a *S. aureus* ATCC27543 cultivado en cajas con medio LB. A continuación se preparó un fluido de inoculación bajo las indicaciones del proveedor GN/GP/IF/ (BiOLOG MicroStation™), a dicho fluido se le agregaron 3 gotas de tioglicolato de sodio concentrado (7.6%) para una concentración final de 5 mM. Con el fluido de inoculación el cultivo se ajustó en un turbidímetro (Biolog 21907) a una transmitancia del 20% +/- 2%. Posteriormente se colocaron 150 µl del inóculo preparado en una caja de 96 pozos en las microplacas GP2. Las microplacas GP2 contienen 96 sustratos que se dividen en grupos: aminas y amidas (4 pozos), polímeros (7 pozos), carbohidratos (41 pozos), ácidos carboxílicos (16 pozos), aminoácidos (8 pozos) y varios (20 pozos). Después, las placas se incubaron a 37°C, realizando lecturas a 590 y 750 nm a las 0, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h posteriores a la incubación en la unidad Biolog MicroStation, utilizando el programa Microlog 3 Release 4.20.

8.7 Evaluación de la formación de biofilm

Técnica por cristal violeta. Una colonia de la clona SCV fue cultivada en caldo tripticaseína de soya con 1 µg/ml de gentamicina a 37°C, 180 rpm por 24 h. La cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543 fue utilizada como control, la cual se cultivó en caldo LB a 37°C, 180 rpm por 16 h. Posteriormente se ajustó la DO₅₉₅ de los cultivos a 0.2, luego se colocaron 150 µl de cada uno en una placa de 96 pozos (Corning) o en micro placas de Biolog GP2 (BiOLOG) y se incubaron por 24 y 48 h a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se removió cuidadosamente el medio de cultivo, lavando 3 veces con buffer PBS (buffer salino de fosfatos), se añadieron 150 µl de cristal violeta 0.4% y se incubó por 10 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se lavó 3 veces con buffer PBS, se añadió 150 µl ácido acético 33% y se realizó la lectura a 595 nm en un equipo iMark microplate reader (Bio-Rad).

Técnica por MTT. Las bacterias fueron crecidas como se indicó en el apartado anterior. Se ajustó la DO₅₉₅ a 0.2 y se colocaron 200 µl de cada uno de los cultivos en una placa de 96 pozos (Corning) y se incubó a 37°C por 24 y 48 h. Una vez cumplidos los tiempos se removió el medio de cultivo, se lavó 3 veces con buffer PBS y posteriormente se añadió 10 µl de MTT (5 mg/ml) (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma) y se incubó durante 2 h. Finalmente, se adicionó 200 µl de isopropanol: HCl (19:1) y se realizó la lectura a 595 nm en el equipo iMark microplate reader (Bio-Rad).

8.8 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Para determinar la susceptibilidad microbiana de la clona SCV y la cepa silvestre se utilizaron sensidiscos con diferentes antibióticos. La clona SCV-ATCC27543 fue crecida en caldo soya tripticaseína (BD Bioxon) con gentamicina (1 µg/ml) y la cepa silvestre fue crecida en caldo LB, ambas a 37°C, 180 rpm durante toda la noche. Después la DO₅₉₅ fue ajustada a 0.1 y se distribuyeron 200 µl en placas de agar Muller-Hinton. A continuación se colocó un sensidisco (BIORAD, Multidiscos Gram positivos II) como se especifica en la Tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos usados en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Agente antimicrobiano (mm)	Concentración µg	Diámetro de halo de inhibición		
		R	I	S
Ampicilina (AM)	10	≤28	-----	≥29
Cefalotina (CF)	30	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima (CTX)	30	≤14	15-22	≥23
Cefepime (FEP)	30	≤14	15-17	≥18

Cefuroxima (CXM)	30	≤14	15-22	≥23
Dicloxacilina (DC)	1	≤10	11-12	≥13
Eritromicina (E)	15	≤13	14-22	≥23
Gentamicina (GE)	10	≤12	13-14	≥15
Levofloxacina (LEV)	5	≤13	14-16	≥17
Pencilina (PE)	10U	≤28	-----	≥29
Tetraciclina (TE)	30	≤14	15-18	≥19
Trimetropim- (SXT)	25	≤10	11-15	≥16
Sulfametoxazol				

En la tabla se muestran los diámetros de los halos de inhibición donde R=resistencia I=intermedio y S= sensible. Multidisco Gram Positivos II CAT 71080480-BIO-RAD.

8.9 Cultivo primario de CEMB

Las células de epitelio mamario bovino fueron obtenidas del tejido alveolar de la ubre de una vaca lactante libre de mastitis, las cuales fueron aisladas y cultivadas como se ha descrito previamente (Anaya *et al.*, 2006). Para el estudio se utilizaron solo células de pasajes 4-7. Las CEMB se cultivaron en cajas de Petri (Costar-Corning) con un medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM/F12, Sigma), suplementado con penicilina-estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente, Gibco), 10% de suero fetal bovino (Sigma), insulina e hidrocortisona (10 µg/ml respectivamente, Sigma).

8.10 Evaluación de la persistencia intracelular de *S. aureus* en las CEMB

La persistencia de la clona SCV de *S. aureus* en las CEMB fue evaluada mediante ensayos de protección con gentamicina. Para ello, las células fueron crecidas en cajas de 24 pozos hasta una confluencia del 60%, luego se infectaron con la bacteria durante 2 h. Se evaluaron las siguientes multiplicidades de infección (MDI): 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 y 100:1 (bacterias por célula). Después de la infección, las CEMB fueron lavadas con PBS (pH 7.4) tres veces, y se adicionó gentamicina (80 µg/ml) en medio F12/DMEM con 1% de suero fetal bovino, por 1, 24, 48 y 72 h. El medio con gentamicina fue reemplazado cada 24 h. Finalizados los respectivos tiempos, las células fueron despegadas con tripsina (5 mg/ml), y se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. Finalmente, las células se lisaron con 200 µl de H₂O destilada estéril y se distribuyó el total del lisado en cajas de agar soya tripticaseína + 1 µg/ml de gentamicina, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Las unidades formadoras de colonias fueron contadas manualmente.

8.11 Evaluación de la inducción de apoptosis por la clona SCV-ATCC27543

La inducción de apoptosis en las CEMB infectadas con la clona SCV de *S. aureus*, se analizó mediante el uso de anexina V (Invitrogen). Para lo cual, las CEMB fueron cultivadas como se describió previamente. Después de la infección (30:1 bacterias/célula), las CEMB fueron lavadas con PBS (pH 7.4) tres veces, y se adicionó gentamicina (80 µg/ml) en medio F12/DMEM con 1% de suero fetal bovino durante 24 y 48 h. El medio con gentamicina fue reemplazado cada 24 h. Finalizados los respectivos tiempos, las células se despegaron con tripsina (5 mg/ml), la cual posteriormente se inactivó con medio F12K/DMEM con 10% de suero fetal bovino. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min, posteriormente fueron lavadas con 100 µl de PBS y resuspendidas en 100 µl de PBS. La pastilla fue recuperada centrifugando a 2500 rpm durante 10 min y se les adicionó 20 µl de buffer de anexina V (Hepes 100 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM), posteriormente se le adicionó 1 µl de anexina V (Invitrogen) y 1 µl de 7AAD (BioLegend) (1:4 en PBS), se incubó 15 min a

temperatura ambiente y se adicionó 80 µl de buffer de anexina V. Finalmente, la lectura fue realizada en un citómetro de flujo Accuri C6 de Beckton-Dickinson. Los datos se analizaron en el programa Flow Jo V10.

8.12 Análisis de datos

Los resultados que se muestran se obtuvieron del promedio de tres experimentos independientes por triplicado. Las comparaciones se realizaron por medio de ANOVA con un factor *post hoc* Dunnet. Los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para el análisis de apoptosis por citometría de flujo se realizó una prueba *t* de *Student*, comparando con el control sin infección en cada tiempo. Los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para el análisis de RT-qPCR se tomaron como significativamente diferentes la expresión de ARNm cuyos valores fueran mayores a 2 y menores a 0.5 (Morey *et al.*, 2006). Los datos de RT-qPCR fueron normalizados respecto al control *S. aureus* ATCC24573 incubado durante 2 h.

9. RESULTADOS

9.1 Generación de una variante de colonia pequeña de *S. aureus* ATCC27543

Para generar la clona SCV de *S. aureus* se sometió a la cepa silvestre a un estrés inducido con gentamicina, de acuerdo a lo descrito en la sección de metodología. Las colonias recuperadas a partir de las placas de agar fueron seleccionadas mediante sus características coloniales (ej. color y tamaño), además del uso de pruebas bioquímicas (ej. prueba de coagulasa). En un primer escrutinio se seleccionaron 12 posibles variantes no hemolíticas y de color blanco (Figura 4). Sin embargo, una vez realizados los ensayos de estabilidad y reversión del fenotipo, solo una de las posibles clonas mantuvo el fenotipo colonial SCV y un retraso en su crecimiento. A esta clona se le denominó SCV-ATCC27543. La estabilidad de esta clona se estableció evaluando el tiempo generacional a través de subcultivos. La clona SCV se consideró estable debido a que su tiempo de generación fue de 523 min, el cual fue ~4 veces mayor respecto a la cepa silvestre (119 min); esta es una de las características que distingue a las SCV (Figura 5). Este resultado fue la primera evidencia de que se había seleccionado una SCV estable de *S. aureus* ATCC 27543.

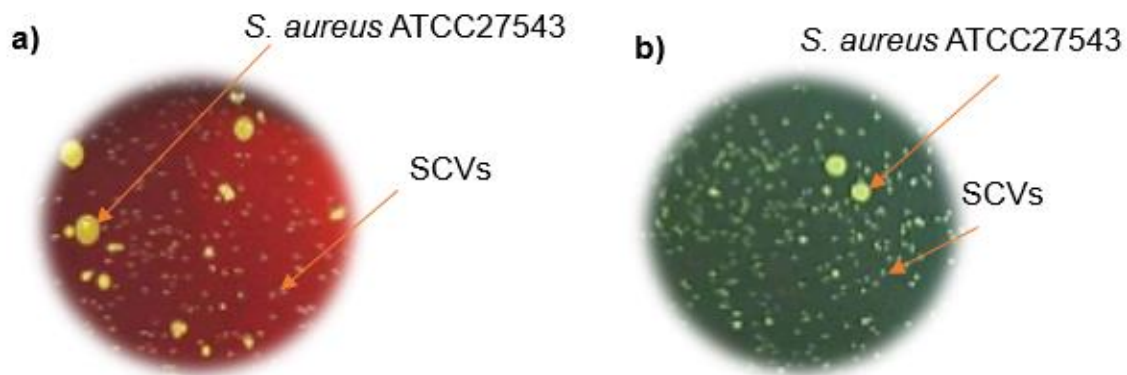


Figura 4. Generación de la clona SCV de *Staphylococcus aureus* ATCC27543. La bacteria fue crecida a 37°C en caldo LB con 1 µg/ml de gentamicina durante 48 h. **a)** Agar sangre suplementado con 5% de sangre de cordero por 72 h. **b)** Agar TCS con 1 µg/ml gentamicina por 72 h.

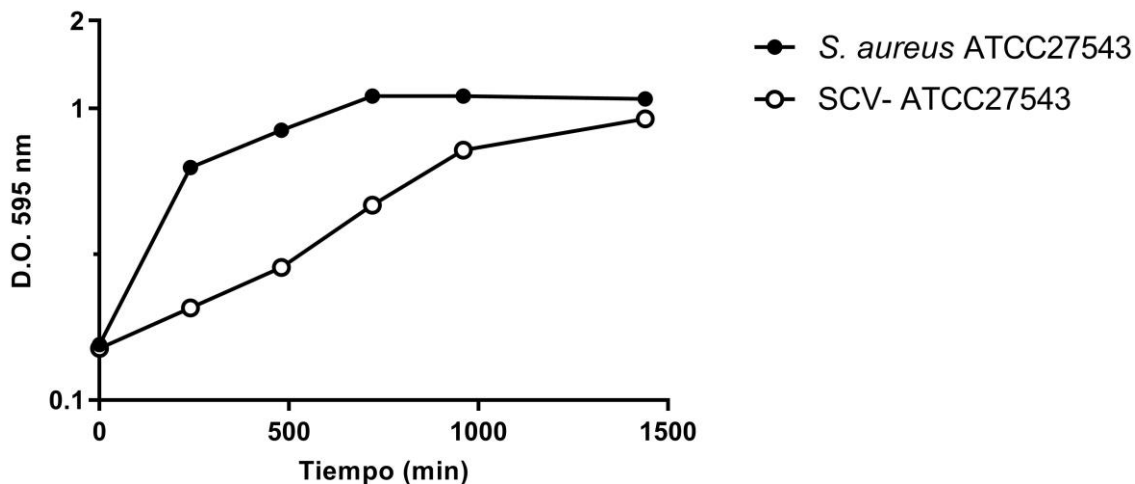


Figura 5. Prueba de estabilidad de la clona SCV de *S. aureus* ATCC27543. La clona SCV se cultivó en caldo infusión cerebro corazón (BHI) midiendo la D.O. cada 4 horas por 24 h. La cepa silvestre *S. aureus* ATCC 27543 fue utilizada como control. Cada punto representa el promedio de triplicados \pm desviación estándar de dos experimentos independientes.

9.2 Caracterización de la clona SCV-ATCC27543

Una vez seleccionada la clona SCV-ATCC27543, se realizaron distintas pruebas bioquímicas con el fin de caracterizarla. Se inició con la prueba de hemólisis en placas de agar sangre suplementado con 5% de sangre de oveja. Los resultados mostraron que la clona SCV generaba hemólisis hasta las 48 h, a diferencia de la cepa silvestre, la cual desde las 16 h ya presentaba hemólisis (Figura 6a). Después se evaluó la fermentación de manitol en placas de agar sal manitol, observando que la clona SCV no fermentó manitol ya que solo se presentaron colonias rojas rodeadas de una zona del mismo color hasta tonalidades púrpura (Figura 6b). Además, se observó la falta de pigmentación de la clona SCV, a diferencia del color dorado característico de la cepa silvestre. Asimismo, el tamaño de la colonia de la clona SCV fue ~ 10 veces menor respecto a la cepa silvestre (Figura 6c).

Para determinar el tipo de auxotrofismo de la clona SCV-ATCC27543 se cultivó la bacteria en placas de agar soya tripticaseína suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de timidina y 2 $\mu\text{g/ml}$ de menadiona de manera independiente. En el caso de timidina la clona SCV no revirtió su fenotipo, lo que indica que esta no presenta alteraciones en la ruta de síntesis de esta molécula (Figura 6d). Sin embargo, al crecer la clona SCV en presencia de menadiona se observó una reversión del fenotipo, lo que indica que la clona tiene alterada la ruta de síntesis de menadiona (Figura 6e).

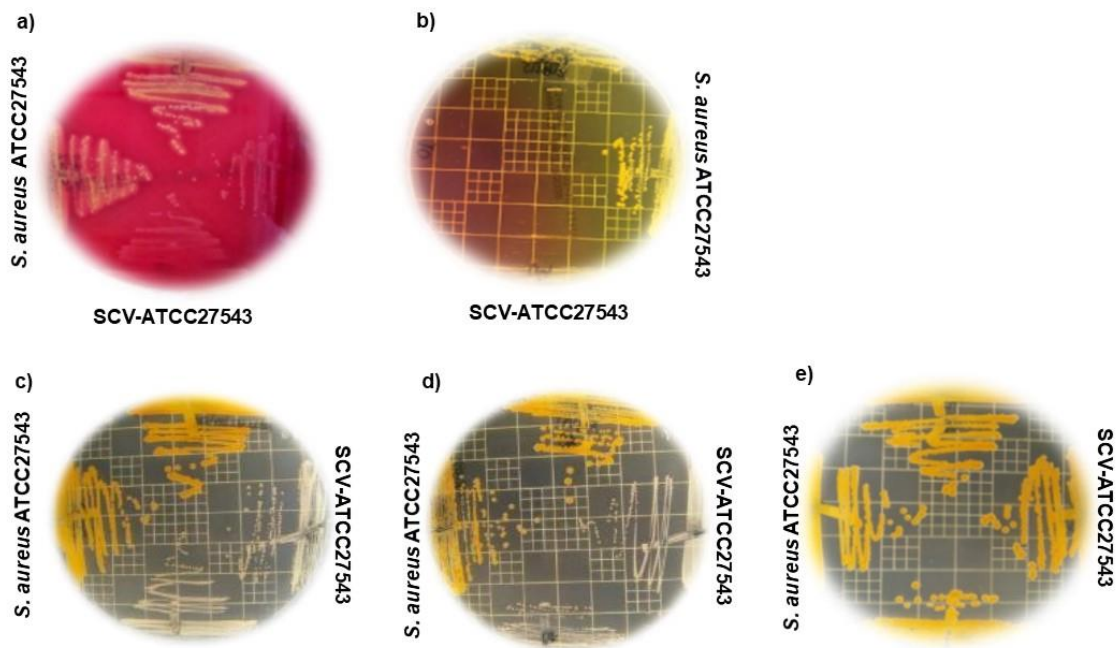


Figura 6. Caracterización de la clona SCV-ATCC27543. Las bacterias fueron crecidas a 37°C en: **a)** agar sangre suplementado con 5% de sangre de cordero (hemólisis) por 24 h; **b)** agar sal manitol (fermentación de manitol) por 48 h; **c)** agar TCS 1 $\mu\text{g/ml}$; **d)** agar TCS + 100 $\mu\text{g/ml}$ timidina (auxotrofismo en timidina) por 72 h; **e)** agar TCS + 2 $\mu\text{g/ml}$ menadiona (auxotrofismo en menadiona) por 72 h.

9.3 Evaluación de la expresión de genes de virulencia en la clona SCV-ATCC27543

Continuando con la caracterización de la clona SCV-ATCC27543, se evaluó la expresión de los genes de virulencia relacionados con el fenotipo SCV. La identidad de la clona fue corroborada analizando la expresión del gen *nuc*, el cual es utilizado para identificar a *S. aureus*. Mediante PCR en punto final se obtuvo el amplicón esperado para este gen (267 pb), con lo cual se demostró que la clona pertenece a *S. aureus* (Figura 7a).

Posteriormente, la expresión de los genes *agrA*, *RNAIII* y *fnbpA* en la clona SCV-ATCC27543 fue evaluada por qPCR (Figura 7). Se utilizó como control la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543. Las evaluaciones se realizaron a las 2 y 24 h de cultivo para la cepa silvestre, y durante 24 y 48 h para la clona SCVs. Los resultados mostraron que la expresión del gen *agrA* en la clona SCV-ATCC27543 disminuyó ~98% a las 24 h, y ~99% a las 48 h, respecto a la cepa silvestre (2 h de cultivo) (Figura 7b). Asimismo, la expresión del gen *RNAIII* no se modificó significativamente en la clona SCV (Figura 7c). En el caso de la expresión del gen *fnbpA*, en la clona SCV-ATCC 27543 se observó una notable disminución de la expresión en ambas condiciones (~99%), respecto a la cepa silvestre (Figura 7d). En conjunto, estos resultados indican que la clona SCV-ATCC 27543 presenta disminuido el sistema Agr, lo cual soporta molecularmente el hecho de que se trata de una variante de colonia pequeña.

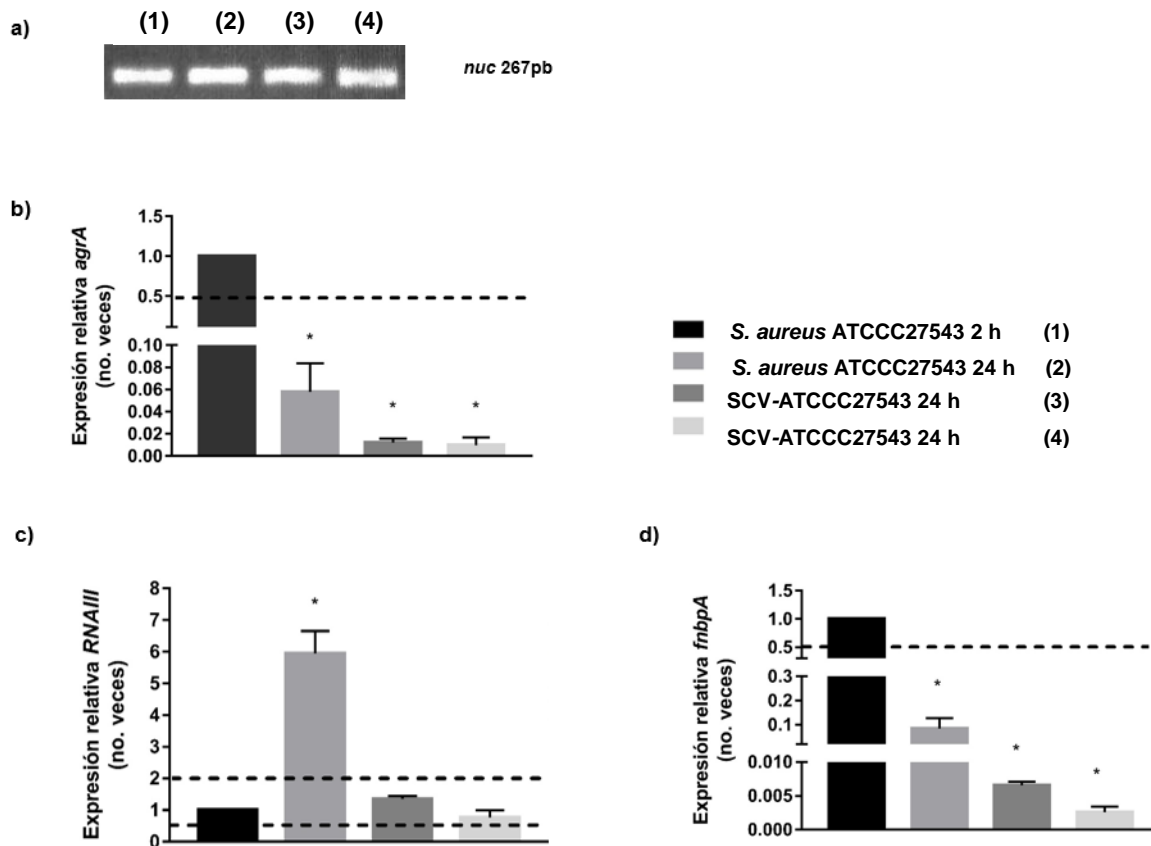


Figura 7. Expresión de genes de virulencia en la clona SCV-ATCC27543. Expresión de genes de *S. aureus*: **a)** Amplificación por PCR del gen *nuc*. Carril 1) *S. aureus* ATCC27543, 2 h; 2) *S. aureus* ATCC27543, 24 h; 3) SCV-ATCC27543, 24 h; y 4) SCV-ATCC27543 a 48 h. Análisis de qPCR que muestra la expresión de **(b) *agrA***, **(c) *RNAIII*** y **(d) *fnbpA*** en *S. aureus* ATCC27543 a las 2 y 24 h, y SCV-ATCC27543 a las 24 y 48 h. El control corresponde a *S. aureus* ATCC27543 a las 2 h. Cada barra muestra la media de los duplicados y el error estándar de dos experimentos. Se consideran significativos los valores mayores a 2 y menores a 0.5. Se utilizó el gen *16S* como el control endógeno. El símbolo (*) indica cambios significativos en relación con el control.

9.4 La clona SCV-ATCC27543 tiene el metabolismo modificado respecto a la cepa silvestre

A continuación, se realizó una evaluación de las capacidades metabólicas de la clona SCV-ATCC27543 respecto a la cepa silvestre mediante el sistema Biolog GP2. Las microplacas GP2 contienen 96 sustratos que se dividen en grupos: aminas y amidas, polímeros, carbohidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos y varios. Los análisis se realizaron a las 4, 12, 24 y 48 h posteriores a la incubación. Los resultados mostraron que en el caso de la clona SCV-ATCC27543, ésta metabolizó 90 de los sustratos a las 12 h de crecimiento, mientras que solo 76 a las 48 h. Por otro lado, la cepa silvestre *S. aureus* metabolizó 84 sustratos a las 24 h y solo 69 a las 12 h (Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación del uso de sustratos de carbono en la clona SCV-ATCC27543 en placas de Biolog.

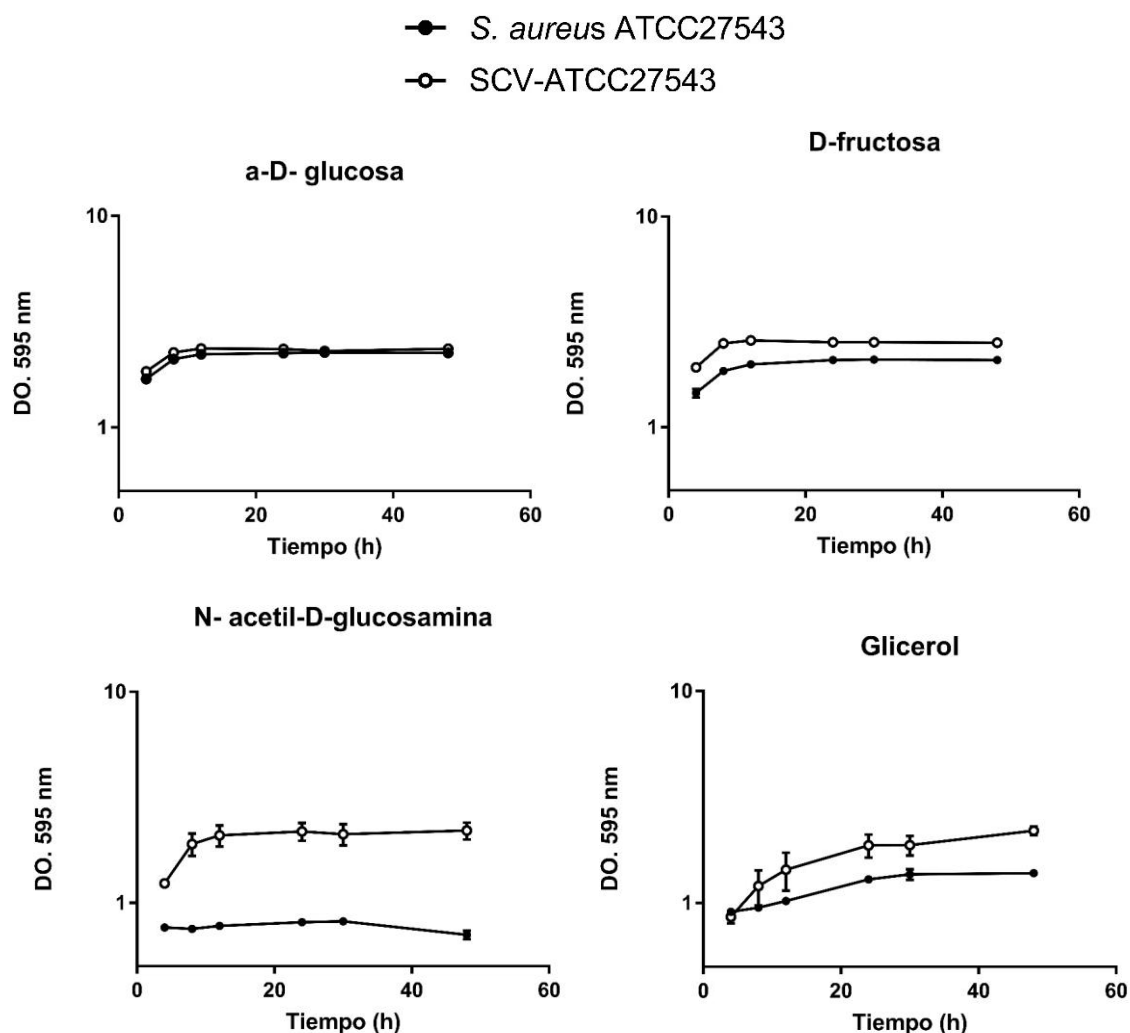
Grupo químico	Sustrato	SCV-ATCC27543				<i>S. aureus</i> ATCC2754			
		4 h	12 h	24 h	48 h	4 h	12 h	24 h	48 h
Carbohidratos	Manana	*	*	*	*	*	*	*	*
	N-acetil-D-glucosamina	**	****	****	****	*	*	*	*
	N-acetil-β-D-manosamina	**	*	*	*	*	*	*	*
	L-arabinosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	D-arabitol	-	*	*	*	-	-	*	-
	Arbutin	*	*	*	*	-	-	*	*
	D-celobiosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	D-fructosa	****	*****	*****	****	**	***	****	*****
	L-fucosa	*	*	*	*	-	*	-	*
	D-galactosa	*	*	*	-	*	-	*	*
	Gentibiosa	*	*	*	*	*	*	*	-
	α-D-glucosa	****	*****	*****	****	**	****	****	*****
	m-inositol	-	*	*	*	*	*	*	*

	α -D-lactosa	-	*	*	*	-	-	*	-
	Lactulosa	*	*	*	*	*	-	*	*
	Maltosa	****	*****	*****	****	**	***	****	****
	Maltotriosa	****	*****	*****	****	*	***	****	****
	D-manitol	*	*	*	*	*	**	**	**
	D-manosa	***	*****	*****	****	*	***	***	****
	D-melezitosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	D-melibiosa	*	*	*	-	*	-	*	*
	α -metil-D-galactósido	*	*	*	*	-	-	-	-
	β -metil-D-galactósido	*	*	*	*	*	-	*	*
	3-metil-D-glucosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	α -metil-D-glucósido	*	*	*	*	*	*	*	*
	β -metil-D-glucósido	*	***	****	****	*	*	*	**
	α -metil-D-manósido	*	*	*	*	-	-	*	*
	Palatinosa	*	**	*	*	*	*	*	**
	D-psicosa	****	*****	*****	****	*	***	***	****
	D-rafinosa	*	*	*	*	*	-	*	*
	L-ramnosa	*	*	-	-	*	*	*	*
	D-ribosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	Sedoheptulosa	*	*	*	-	*	*	*	*
	D-sorbitol	*	*	*	*	*	*	*	*
	Estaquiosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	Sacarosa	****	*****	*****	****	*	***	****	****
	D-tagatosa	*	*	*	*	*	*	*	*
	D-trehalosa	****	*****	*****	****	*	**	***	****
	Turanosa	**	*****	*****	****	*	**	***	****
	Xilitol	*	*	*	-	*	-	*	*
	D-xilosa	*	*	*	-	*	*	*	*
Ácidos carboxílicos									
	D- ácido galacturónico	*	*	-	-	*	*	*	*
	D-ácido glucónico	*	*	*	*	-	-	*	*

	Ácido acético	*	*	*	*	*	-	-	*
	Ácido α - hidroxibutírico	*	*	*	*	*	*	*	*
	Ácido β - hidroxibutírico	*	*	*	-	-	-	-	*
	Ácido γ - hidroxibutírico	*	*	*	*	*	*	*	*
	Ácido P- hidroxifenilacético	*	*	*	*	-	-	*	*
	Ácido α -cetoglutarico	*	*	*	*	*	*	*	*
	Ácido α - cetovalérico	*	*	*	*	-	*	*	*
	Ácido L- láctico	**	***	**	**	*	*	*	*
	Ácido D- málico	**	***	**	**	*	*	*	*
	Ácido L-málico	**	***	**	**	*	*	*	*
	Ácido propiónico	*	*	*	-	-	-	-	-
	Ácido pirúvico	*	**	*	**	*	*	*	*
	Ácido succínico	*	*	*	*	*	*	*	*
	Ácido N- acetil-L-glutámico	*	*	*	*	-	-	-	*
Polímeros									
	Dextrina	**	***	***	***	*	***	***	****
	Tween 40	-	-	-	-	*	*	*	*
	Inulina	-	-	-	-	*	*	*	-
	α -ciclodextrina	-	-	-	-	*	*	*	-
	β -ciclodextrina	-	-	-	-	*	*	*	-
	Tween 80	*	-	-	-	-	-	*	-
	Glicógeno	*	*	*	*	-	-	-	-
Aminoácidos									
	D- alanina	*	*	*	*	-	*	*	*
	L- alanina	*	*	*	*	*	*	*	*
	L-alanil-glicina	*	*	*	-	*	*	*	*
	L- asparagina	*	*	*	-	*	-	-	-
	Ácido L glutámico	*	*	*	-	*	*	*	*
	Ácido glicil-L-glutámico	*	*	*	-	-	-	-	*
Ácido L piroglutámico	*	*	-	-	-	-	*	*	

	L- serina	*	*	*	*	-	-	-	*
Amidas / aminas	Lactamida	-	-	*	*	*	*	*	*
	Ácido succinámico	*	*	*	*	*	-	*	*
	L- alanamida	*	*	*	*	*	*	*	*
	Putrescina	*	*	*	*	*	*	*	*
Varios	Amigdalina	*	*	*	*	*	*	*	*
	Salicina	*	*	*	-	-	-	-	-
	Ácido D- láctico metil éster	*	*	*	*	-	-	-	-
	Ácido pirúvico metil éster	*	**	**	**	*	*	*	*
	Ácido succínico metil éster	*	*	*	*	*	-	*	*
	2,3-butanodiol	*	*	*	*	*	*	*	*
	Glicerol	*	***	***	****	*	*	**	*
	Adenosina	*	*	*	*	*	*	*	*
	2'-deoxi adenosina	*	*	*	*	-	*	*	*
	Inosina	*	**	**	**	*	*	*	*
	Timidina	*	*	*	*	*	*	*	*
	Uridina	*	***	**	***	-	*	*	*
	Adenosina - 5' monofosfato	*	*	*	*	*	*	*	*
	Timidina- monofosfato 5'	*	***	*	*	*	*	*	*
	Uridina-5' monofosfato	*	*	*	*	*	*	*	**
	D- fructosa-6 fosfato	*	*	*	*	*	*	*	*
	α-D- glucosa-1-fosfato	*	*	*	*	*	*	*	*
	D- glucosa-6- fosfato	*	**	*	*	*	*	*	*
D-L-α-glicerol-fosfato	*	*	*	*	*	*	*	*	
* 0.001-0.75, ** 0.76-1.509, *** 1.51-2.259, ****2.26-3.00. *****3.01 - <, - negativo (Valores de DO _{595 nm}).									

En particular, algunos carbohidratos como la α -D-glucosa fueron metabolizados por ambas cepas alcanzando un consumo estable a partir de las 12 h. No obstante, otros sustratos fueron mejor utilizados por la clona SCV-ATCC27543 respecto a la cepa silvestre, como la D-fructosa, sacarosa y maltosa. Asimismo, hubo sustratos que no fueron metabolizados por la cepa silvestre pero si por la clona SCV-ATCC27543, como el glicerol y N- acetil-glucosamina. Estos resultados se presentan en la figura 8.



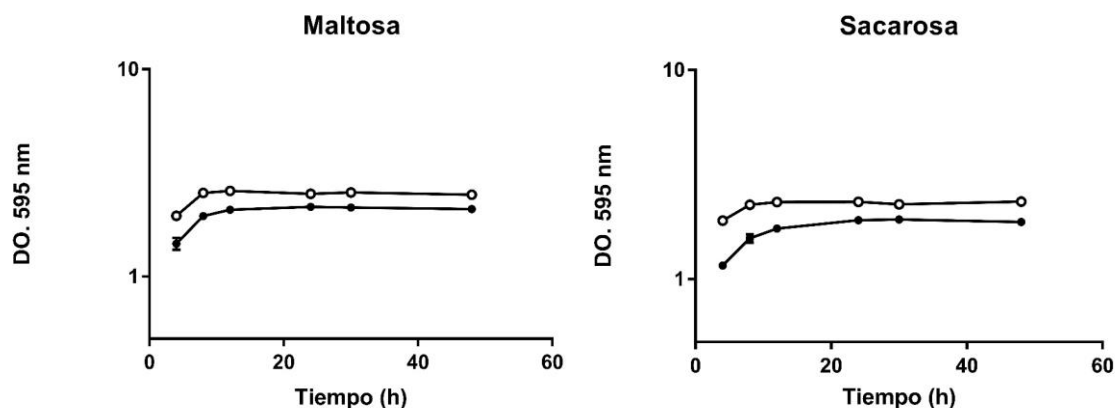


Figura 8. Consumo de sustratos de carbono en placas de Biolog por la clona SCV-ATCC27543. Se creció a *S. aureus* ATCC27543 y a la clona SCV-ATCC27453 en fluido de inoculación, colocándolas en microplacas GP2 de Biolog y se evaluó el consumo a las 4, 8, 12, 24, 30 y 48 h. Se muestra el metabolismo de a) α -D- glucosa, b) N-acetil-glucosamina, c) Maltosa, d) D- fructosa, e) Sacarosa y f) Glicerol. El control corresponde al consumo en agua en cada tiempo evaluado. Cada punto muestra la media y el error estándar de dos experimentos.

9.5 La clona SCV-ATCC27543 de *S. aureus* es sobreproductora de biofilm

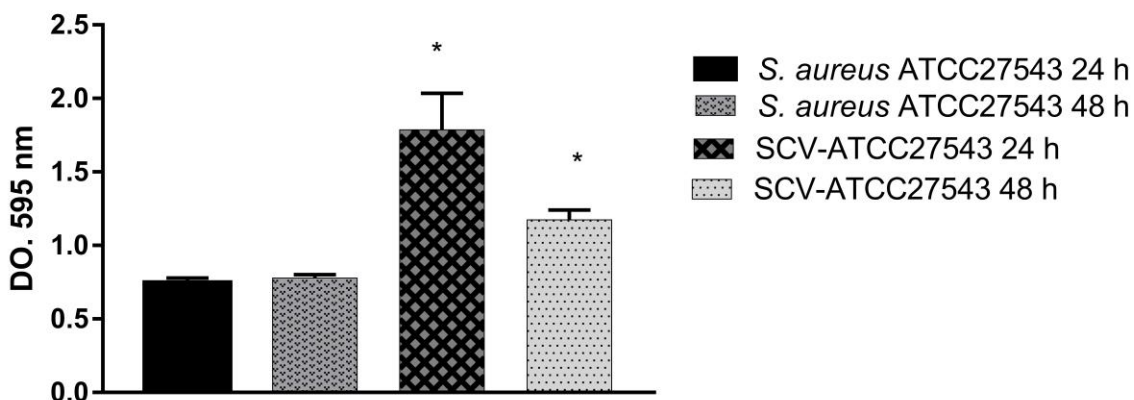
La formación de biofilm en la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543 y la clona SCV-ATCC27543 fue evaluada a las 24 y 48 h a través de dos métodos (cristal violeta y MTT). Como se observa en la figura 9, en ambas cepas se detectó la formación de biofilm mediante cristal violeta, pero se observó una mayor producción (2.4 veces) en la clona SCV-ATCC27543 a las 24 h, la cual se mantuvo aún a las 48 h (1.5 veces), respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, cuando se evaluó la formación de biofilm con MTT no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas, pero se observó una mayor actividad metabólica a las 48 h en ambas cepas (Figura 9b). Esto fue atribuido a un mayor número de UFC recuperadas, para el caso de la cepa silvestre a las 24 h se obtuvieron 2.6×10^6 UFC mientras que a las 48 h se recuperaron 5.8×10^6 UFC. En el caso de la clona SCV-ATCC27543 se obtuvieron 1.3×10^6 UFC a las 24 h, y 2.2×10^6 UFC las 48 h (Tabla 4). Interesantemente, existen ~3 veces más UFC recuperadas en

la cepa silvestre en comparación de la clona SCV-ATCC24753 a las 48 h, pero hay mayor actividad metabólica en esta última. Esto puede deberse a que las bacterias en la cepa silvestre podrían encontrarse en la fase estacionaria por lo que su actividad metabólica no es muy alta. En este mismo sentido la clona SCV-ATCC24753 al tener un crecimiento lento, las bacterias aun podrían encontrarse en la fase exponencial y por lo tanto presentar una mayor actividad metabólica.

Tabla 4. Número de UFC recuperadas en Biofilm de la clona SCV-ATCC27543 en comparación con la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543.

Microorganismo	Tiempo (h)	UFC
<i>S. aureus</i> ATCC27543	24	2.6x10 ⁶
<i>S. aureus</i> ATCC27543	48	5.8x10 ⁶
SCV-ATCC27543	24	1.3x10 ⁶
SCV-ATCC27543	48	2.2x10 ⁶

a) **Evaluación de biofilm por cristal violeta**



b) **Evaluación de biofilm por MTT**

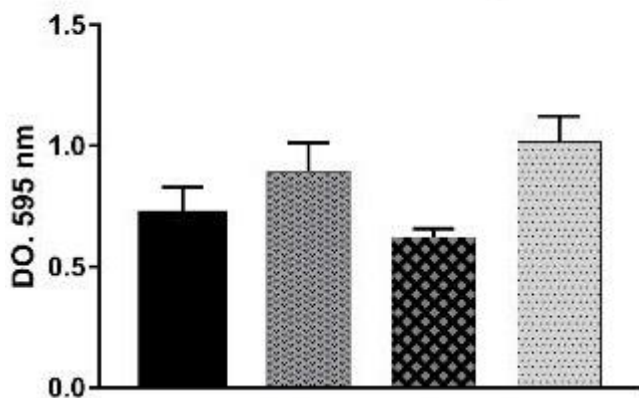


Figura 9. Evaluación de la formación de biofilm en la clona SCV-ATCC27543. Evaluación de la formación de biofilm por: **(a)** cristal violeta y **(b)** MTT en *S. aureus* ATCC27543 y SCV-ATCC27543 a las 24 y 48 h. Cada barra muestra la media de los triplicados y el error estándar de tres experimentos. Se realizó una ANOVA de una vía post hoc Dunnet ($P < 0.05$). El símbolo (*) indica cambios significativos en relación al control (*S. aureus* ATCC27543 a las 24 h).

Asimismo, se utilizaron las placas de Biolog del apartado anterior para evaluar la formación de biofilm dependiente del sustrato (Figura 10). Para este ensayo se utilizó como control la condición de formación de biofilm en agua, la cual se consideró como el 100% de formación de biofilm. En el caso de la clona SCV-ATCC27543 se observó una mayor formación de biofilm en los sustratos D-fructosa 6 fosfato (22%), arbutina (18%), timidina (9%), m-inositol (8%), salicina (4%) y una inhibición de la formación de biofilm en los sustratos ácido α -hidroxibutírico (83%), ácido-L-málico (83%), ácido glicil-L-glutámico (82%), ácido-L-láctico (78%), putrescina (77%), ácido D-láctico metil éster (65%), ácido succínico (55%), D- psicosa (66%), L-fucosa (46%) y Tween 40 (33%). Respecto a la cepa silvestre se observó una mayor formación de biofilm en los sustratos D-glucosa-6-fosfato (50%) y glicógeno (2%), y una inhibición en la formación de biofilm en los sustratos uridina-5´monofosfato (87%), D-celobiosa (83%), ácido propiónico (67%), ácido succinico metil éster (60%), ácido-L-glutámico (57%), maltotriosa (57%), L-arabinosa (55%), β -metil-D- glucósido (49%), 2,3-butanodiol (47%), lactulosa (46%), D-arabitol (45%), Tween 40 (45%), β -ciclodextrina (40%), ácido pirúvico metil ester (36%).

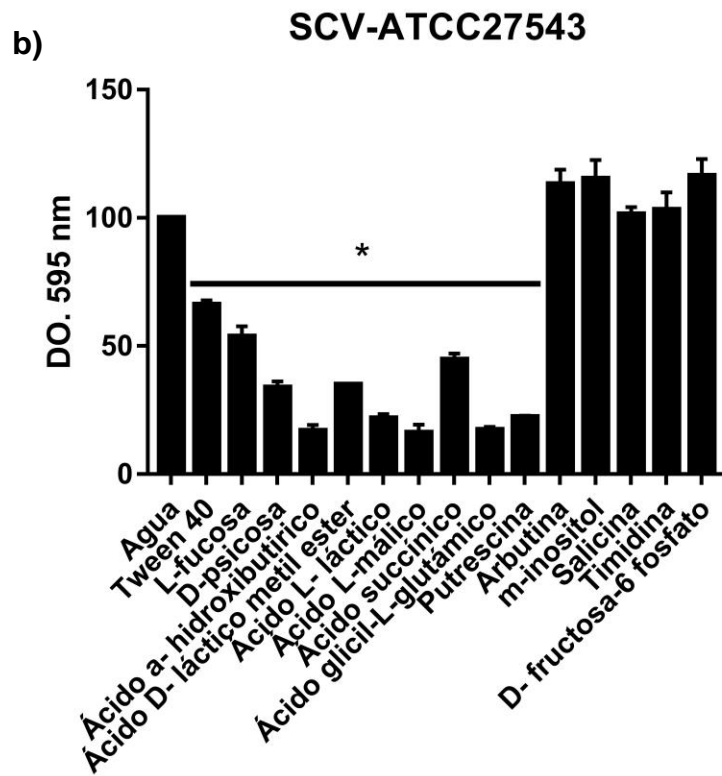
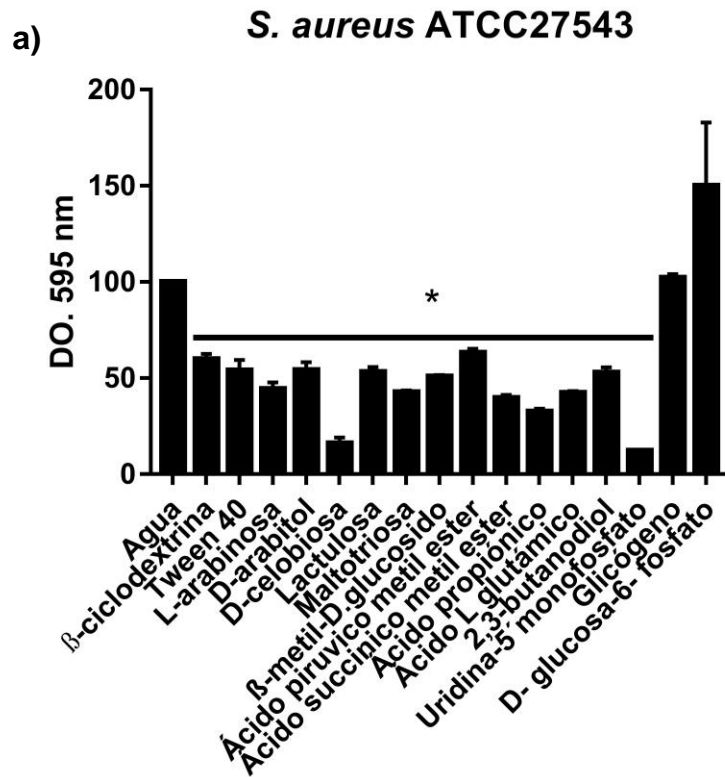


Figura 10. Evaluación de la formación de biofilm con sustratos únicos en la clona SCV-ATCC27543. Evaluación de la formación de biofilm por cristal violeta en microplacas GP2 de Biolog en: **a)** *S. aureus* ATCC27543, y **b)** SCV-ATCC27453 a las 48 h de crecimiento. El control corresponde al biofilm formado en agua. Cada barra muestra la media y el error estándar de dos experimentos. Se realizó una ANOVA de una vía post hoc Dunnet ($P < 0.05$). El símbolo (*) indica cambios significativos en relación al control.

9.6 La clona SCV-ATCC2743 es resistente a los antimicrobianos

La sensibilidad antimicrobiana de la clona SCV-ATCC27543 y la cepa silvestre se evaluó mediante el uso de sensidiscos en placas de agar Muller - Hinton. Interesantemente, la clona SCV-ATCC27543 fue resistente a los 12 antimicrobianos probados, mientras que la cepa silvestre solo presentó resistencia a 4 antimicrobianos, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de la clona SCV-ATCC27543 en comparación con la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543.

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> ATCC27543	SCV-ATCC27543
Ampicilina 10 µg	Resistente	Resistente
Cefalotina 30 µg	Sensible	Resistente
Cefotaxima 30 µg	Sensible	Resistente
Levofloxacin 5 µg	Sensible	Resistente
Cefuroxima 30 µg	Sensible	Resistente
Dicloxacilina µg	Resistente	Resistente
Eritromicina 15 µg	Sensible	Resistente
Gentamicina 10 µg	Sensible	Resistente

Cefepime 30 µg	Resistente	Resistente
Penicilina 10 u	Resistente	Resistente
Tetraciclina 30 µg	Sensible	Resistente
Trimetroprim-sulfametoxazol 25 µg	Sensible	Resistente

9.7 Persistencia de la clona SCV-ATCC27543 en las CEMB

La persistencia intracelular de la clona SCV-ATCC27543 en las CEMB fue evaluada mediante ensayos de protección con gentamicina con algunas modificaciones, como se describió en materiales y métodos. Se utilizó como control la cepa silvestre. Como se observa en la figura 7, la clona SCV-ATCC27543 (MDI 30) internalizó hasta ~200 veces menos respecto a la cepa silvestre a 1 h de persistencia. En el caso de la clona SCV-ATCC27543 se observó una relación directa entre la multiplicidad de la infección con el número de colonias recuperadas, a mayor MDI mayor número de bacterias internalizadas (Figura 11). Además se recuperaron UFC de la clona hasta 72 h después de la infección, sin que se detectará algún daño morfológico en las CEMB. Con estos resultados se concluye que la clona SCV- ATCC27543 persiste intracelularmente en las CEMB.

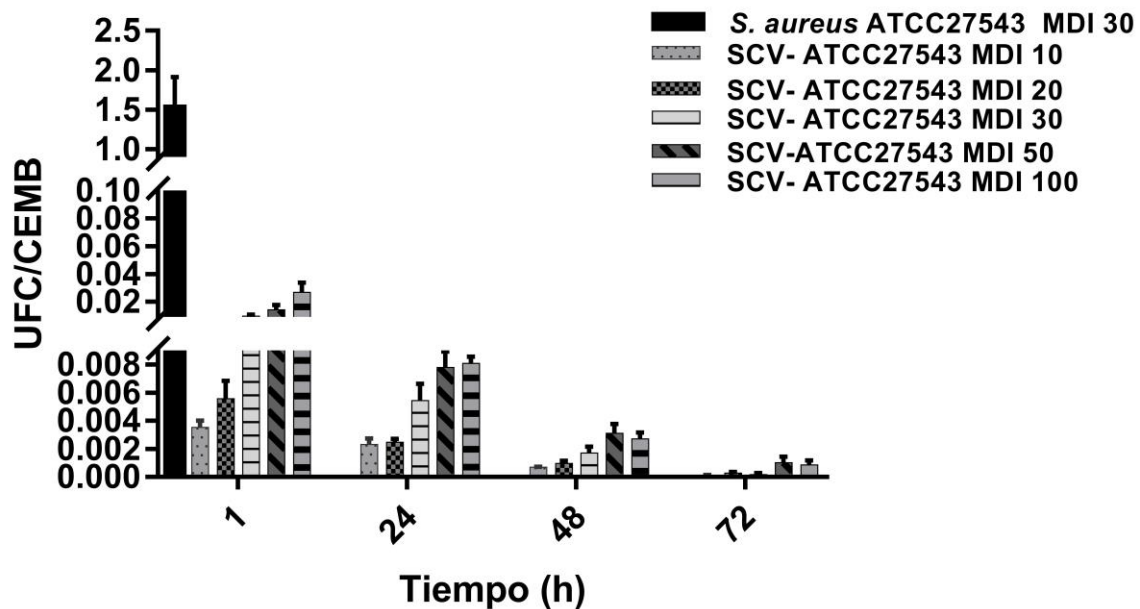
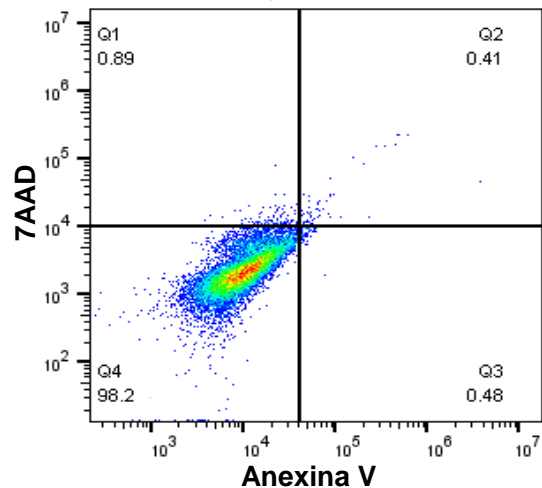


Figura 11. Persistencia intracelular de la clona SCV-ATCC27543 en las CEMB. Se infectaron las CEMB con una MDI de 10, 20, 30, 50 y 100 bacterias por célula. La persistencia intracelular de la clona SCV se evaluó a la 1, 24, 48 y 72 h. Se muestra la relación de UFC recuperadas en relación con el número de CEMB. Se utilizó como control la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543 (MDI 30:1). Cada barra muestra la media de los triplicados y el error estándar de tres experimentos.

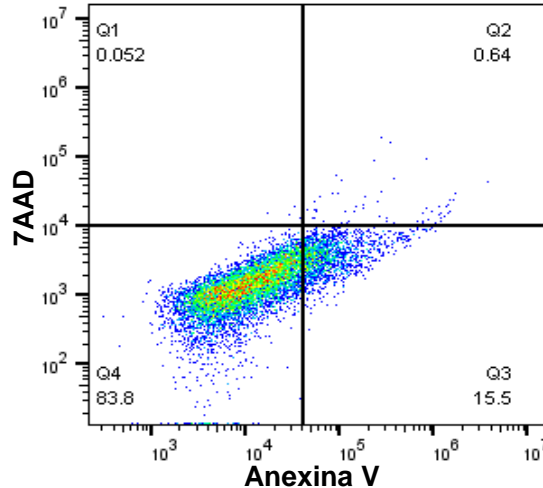
9.8 La clona SCV-ATCC27543 no induce apoptosis en las CEMB

La inducción de la apoptosis en las CEMB por efecto de la clona SCV-ATCC27543 fue evaluada mediante citometría de flujo. Las células infectadas con la cepa silvestre de *S. aureus* (1 h) mostraron una inducción de la apoptosis de ~2.6 veces, con relación a las células sin infectar (Figura 12). Sin embargo, en el caso de las CEMB infectadas con la clona SCV-ATCC27543 a las 24 y 48 h no se detectó la inducción de apoptosis. Estos resultados demuestran que la clona no activa la apoptosis en las CEMB

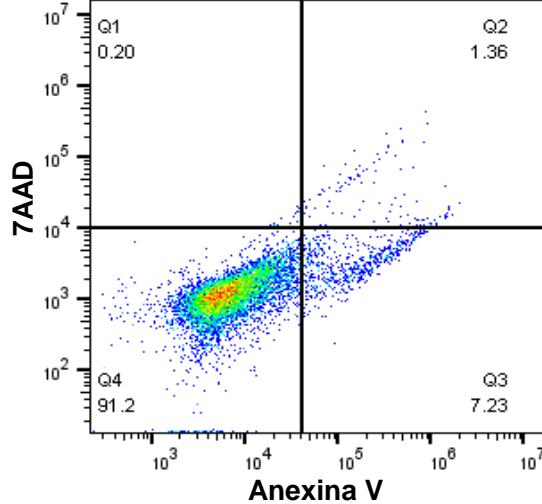
F12 gentamicina 1h



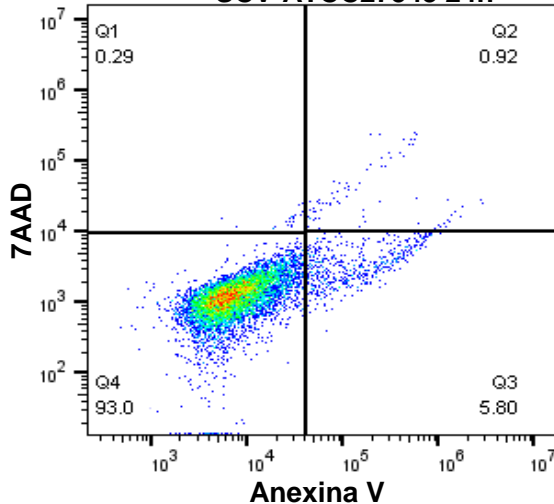
S. aureus ATCC27543 1h



Suplementado 24h



SCV-ATCC27543 24h



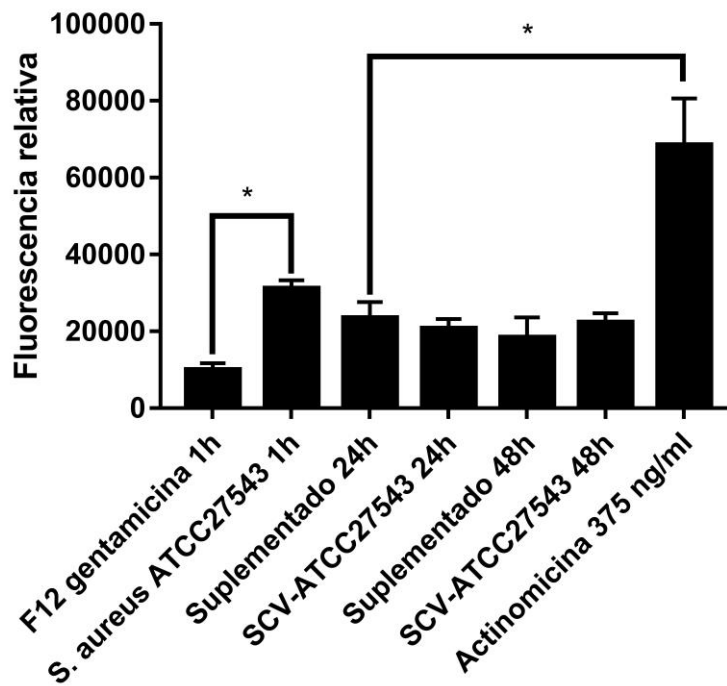
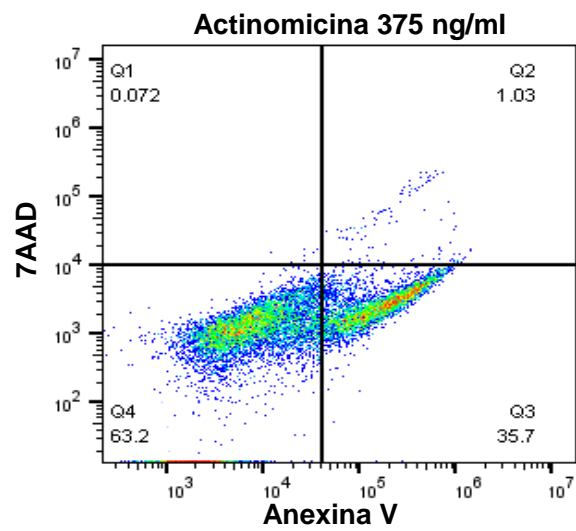
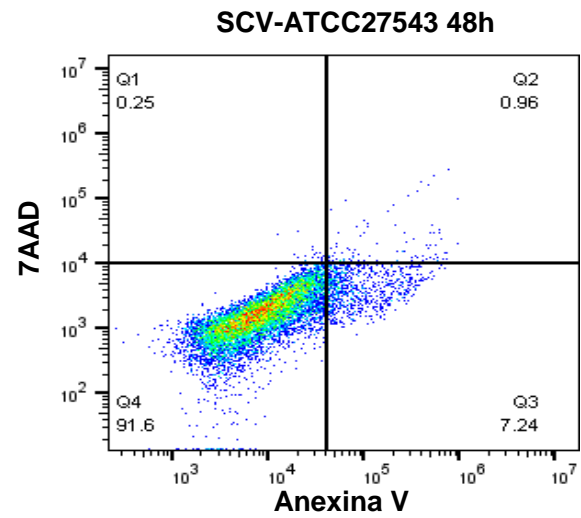
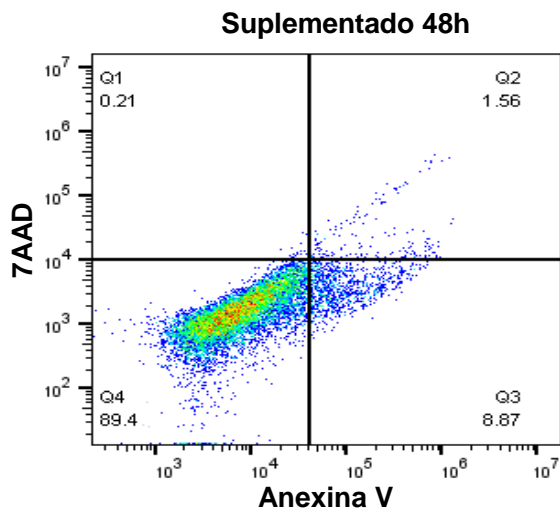


Figura 12. Evasión de la apoptosis de las CEMB infectadas con la clona SCV-ATCC27543. Se infectaron las CEMB con una MDI de 30 de *S. aureus* ATCC27543 o de la clona SCV-ATCC27543 y se evaluó la apoptosis a los tiempos indicados. La evaluación se realizó por citometría de flujo haciendo una tinción con Anexina V/ 7AAD. Como control positivo se utilizaron las células tratadas con actinomicina (375 ng/ml). Como control negativo se usó a las células sin infectar en cada tiempo evaluado. Cada barra muestra la media de los duplicados y el error estándar de un experimento. Se realizó una prueba *t-Student* ($P < 0.05$). El símbolo (*) indica cambios significativos en relación al control.

10. DISCUSIÓN

S. aureus es una bacteria oportunista relacionada con una variedad de infecciones crónicas-persistentes en humanos y animales (Wang y Zhu, 2017). El éxito de este patógeno se ha asociado con la capacidad de adaptarse rápidamente a condiciones ambientales de estrés para sobrevivir y persistir intracelularmente por largos periodos de tiempo, lo cual se ha asociado a la generación de variantes de colonia pequeña (SCVs) (Onyango *et al.*, 2013; Proctor *et al.*, 2014). Las infecciones causadas por las SCVs de *S. aureus* se caracterizan por ser asintomáticas y persistentes, aún con el tratamiento antimicrobiano adecuado. En años recientes se ha asociado también a las SCVs de *S. aureus* con la mastitis bovina subclínica, esta enfermedad se caracteriza por cursar sin signos visibles, la cual es de gran importancia en el sector ganadero debido a las pérdidas económicas severas que ocasiona (Atalla *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011).

En la búsqueda de analizar la relevancia de las SCVs de *S. aureus* con la persistencia de la mastitis bovina subclínica, en este trabajo se generó una clona de una variante de colonia pequeña de *S. aureus* ATCC27543 mediante estrés ocasionado por gentamicina. La clona SCV-ATCC27543 mostró un crecimiento retardado con un tiempo de generación de hasta ~4 veces mayor respecto a la cepa silvestre (Figura 5); además, es auxótrofa para menadiona, presenta hemólisis retardada, sin pigmentación, con un tamaño colonial menor (~10 veces) (Figura 6) y con una disminución notable en la expresión de algunos de los factores de virulencia del sistema Agr (Figura 7). Estos resultados coinciden con varios reportes previos de SCVs de *S. aureus* aisladas de pacientes humanos con osteomielitis crónica que habían recibido tratamiento con aminoglucósidos, las cuales específicamente presentan auxotrofia para menadiona cuando el estrés es inducido por gentamicina (Von Eiff *et al.*, 2006; Acar *et al.*, 1997). La auxotrofia de menadiona genera un desacople de la cadena de transporte de electrones debido a que es un precursor importante para la menaquinona, este desacoplamiento impide la síntesis de carotenoides (Proctor *et al.*, 2006), y es por esto que la clona

SCV-ATCC27543 no presenta el color dorado característico de la cepa silvestre. Además al presentar esta alteración en menadiona existe una reducción en la síntesis de ATP, lo que explica el crecimiento retardado de la clona SCV-ATCC27543 (Lannergard *et al.*, 2008; Balwit *et al.*, 1994). Este crecimiento retardado concuerda con lo reportado por Proctor y colaboradores (1998) quienes señalan que las SCVs de *S. aureus* recuperadas de pacientes con osteomielitis en medio líquido tardan en duplicarse ~180 min, mientras que *S. aureus* silvestre tarda ~20 min.

Se tienen reportes donde las SCVs de *S. aureus* recuperadas directamente de pacientes con una infección persistente presentan el sistema de virulencia Agr inactivado, como consecuencia de que no existe una densidad de crecimiento bacteriana suficiente para su inducción (Pader *et al.*, 2014). Además, la molécula RNAlII que participa en la expresión de moléculas de superficie y daño al tejido según la fase de crecimiento de *S. aureus*, se encuentra ausente (Somerville *et al.*, 2009). Por otro lado, FnbpA que es una molécula de adhesión en las SCVs, se encuentra sobreexpresada de manera independiente al sistema Agr (Kriegeskorte *et al.*, 2014; Proctor *et al.*, 2006; Vaudaux *et al.*, 2002). Al realizar el análisis de la expresión de algunos de los genes de virulencia relacionados con el fenotipo SCV en la clona SCV-ATCC27543, se observó que la expresión del gen *agrA* se encuentra disminuido, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente. Asimismo, la expresión del gen *RNAlII* no se inhibió completamente en la clona SCV-ATCC27543, incluso se encontró una ligera expresión a las 48 h, aunque esta no es significativa. Esta ligera reducción en la expresión de *RNAlII* puede estar asociada con el retraso de la hemólisis que presentó la clona SCV-ATCC27543 (Figura 6a), ya que se ha reportado que la expresión de *RNAlII* favorece la expresión de hemolisinas (Proctor *et al.*, 2006; Vuong *et al.*, 2000). En el caso del gen *fnbpA* la expresión fue casi nula en la clona SCV-ATCC27543. Este es un dato interesante ya que se ha reportado que las SCVs de *S. aureus* presentan una sobreexpresión de esta proteína (Buzzola *et al.*, 2007; Vaudaux *et al.*, 2002); por lo cual se requiere de realizar más estudios al respecto para esclarecer la disminución de la expresión de este gen en la clona SCV-

ATCC27543, y establecer su participación en la generación de la SCV, ya que se ha descrito que la FnBP media la adherencia y la internalización de *S. aureus* en células fagocíticas no profesionales (Alva-Murillo *et al.*, 2014; Clarke y Foster, 2006; Mc Elroy *et al.*, 2002).

Por otro lado, debido al metabolismo disminuido de las SCVs, éstas tienen que adaptarse a las condiciones intracelulares, por lo cual el citoplasma celular les provee sus requerimientos nutricionales (Johns *et al.*, 2015). De ahí la importancia de evaluar el uso de diferentes fuentes de carbono. Sin embargo, existen pocos estudios en la literatura respecto a este tipo de aproximación. En un estudio realizado con la cepa *S. aureus* COL (meticilina resistente), se observó que en condiciones sin restricción de nutrientes metabolizaba N- acetil glucosamina, α -D- glucosa, D-manosa, D-trealosa, D-ácido láctico metil ester, ácido L-láctico, sacarosa y glicerol (Sobral *et al.*, 2007), mismos sustratos que pueden ser metabolizados por la cepa silvestre *S. aureus* ATCC27543. Interesantemente, los resultados mostraron que la clona SCV-ATCC 27543 puede metabolizar un mayor número de fuentes de carbono y lo hace más rápidamente respecto a la cepa silvestre (Tabla 3 y Figura 8). En el estudio de Sobral y col (2007), encontraron que cuando la bacteria fue sometida a una condición estresante baja en nutrientes, la bacteria tuvo la capacidad de utilizar estos mismos sustratos, pero adicionalmente utilizó dextrina, maltosa, α -hidroxibutírico, adenosina, 2-deoxiadenosina, inosina, timidina, uridina y ácido pirúvico metil ester. Se conoce que al someter a *S. aureus* a una condición estresante se activan genes que codifican para enzimas relacionadas con el estrés anaeróbico, enzimas del metabolismo de nitrógeno y enzimas del metabolismo intermediario de purinas y pirimidinas (Sobral *et al.*, 2007). Esto podría explicar por qué la clona SCV-ATCC27543 metaboliza un mayor número de sustratos respecto a la cepa silvestre, favoreciendo así la adaptación de la variante y su persistencia en el medio intracelular.

La presencia de biofilm está frecuentemente relacionada con infecciones crónicas resistentes a antibióticos en *S. aureus* (Krismer y Peschell, 2011; Neut *et*

al., 2007; Vuong *et al.*, 2000). Esto se ha reportado también para SCVs obtenidas de infecciones causadas por *S. aureus* (Johns *et al.*, 2015; Melter *et al.*, 2010). Esto concuerda con los datos obtenidos en la clona SCV-ATCC27543, la cual es una mayor productora de biofilm respecto a su cepa silvestre (Figura 9a). Esta mayor inducción de biofilm ya ha sido reportada para SCVs de *S. aureus*, siendo atribuido a la atenuación del sistema Agr permitiendo la sobreexpresión de proteínas de superficie fundamentales para el desarrollo del biofilm (Akiyama *et al.*, 1997; Krismer *et al.*, 2011; Bui *et al.*, 2014). Se observaron resultados interesantes al evaluar la formación del biofilm con sustratos únicos de carbono, ya que se obtuvo una inhibición en la formación del mismo con ambas cepas en presencia de diferentes sustratos, en especial con varios tipos de ácidos (Figura 10a y 10b). Hasta nuestro conocimiento, no se han hecho estudios de la inhibición de biofilm específicamente con estos sustratos, pero existe un reporte donde se evaluaron ácidos fenólicos, los cuales favorecieron la inhibición de la formación de biofilm en *S. aureus*, que fue atribuida al cambio de pH que puedan inducir en el medio (Silva *et al.*, 2016). En otro estudio, se reportó que los ácidos grasos esterificados con azúcar (C16) inhiben la formación de biofilm de *S. aureus*, probablemente debido a que impiden la adhesión al cambiar la carga eléctrica de la superficie de la membrana celular o al interactuar físicamente entre la célula y la superficie sólida (Soichi *et al.*, 2010). Con estos estudios se podría hipotetizar que la inhibición de biofilm observado en *S. aureus* ATCC27543 y en la clona SCV-ATCC27543 podría atribuirse al cambio de pH en el medio celular o a que los sustratos puedan impedir su adherencia.

Se conoce que las SCVs se generan por una presión selectiva del ambiente provocada usualmente por antibióticos, péptidos antimicrobianos catiónicos, una alta osmolaridad, pH alcalino, entre otros, lo que provoca un desacoplamiento en el potencial de membrana, favoreciendo la resistencia a los antimicrobianos (Proctor *et al.*, 1998). La clona SCV-ATCC27543 fue resistente a todos los antimicrobianos probados (Tabla 4), este resultado era esperado ya que, en el caso específico de los aminoglucósidos como la gentamicina, su ingreso a la célula depende del potencial de membrana y este es drásticamente reducido

cuando la cadena transportadora de electrones disminuye su flujo de electrones (Vestergaard *et al.*, 2016). Como se señaló anteriormente, la clona SCV-ATCC27543 presenta alteración en la síntesis de menadiona (Figura 6e), la cual está involucrada a su vez en la síntesis de la menaquinona, por lo cual tiene alterado el potencial de membrana, esto explica la resistencia a los antimicrobianos que dependen del potencial de membrana para su ingreso a la célula. Además, como consecuencia del lento crecimiento, y por lo tanto de la reducción en la velocidad de la formación de la pared celular, las SCVs también presentan resistencia a los antibióticos cuyo blanco de acción es la pared celular, como lo son los β -lactámicos (von Eiff *et al.*, 2006). Esto último explica la resistencia a β -lactámicos observada en la clona SCV-ATCC27543.

Se ha reportado que *S. aureus* es una bacteria capaz de internalizar en células fagocíticas no profesionales (ej. endotelio, epitelios, fibroblastos) mediante el mecanismo denominado “tipo zipper”, en este mecanismo la bacteria expresa proteínas de superficie (ej. FnBPA, ClfB) las cuales interactúan con la fibronectina y la integrina $\alpha 5\beta 1$ de la célula hospedera induciendo la activación de una ruta de señalización y desencadenando un reacomodo en el citoesqueleto de actina, formando un endosoma y de esta manera la bacteria se internaliza en las células (Alva-Murillo *et al.*, 2014). Se ha descrito que las SCVs de *S. aureus* inducen este mismo mecanismo para su internalización (Johns *et al.*, 2015; Sendi *et al.*, 2009). Los datos muestran que la clona SCV-ATCC27543 internaliza ~200 veces menos respecto a la cepa silvestre (Figura 11), esto puede ser atribuido a que la clona SCV no expresa el gen de la *fnbpA* (Figura 7d), por lo cual no puede interactuar con la fibronectina de la matriz extracelular disminuyendo su internalización. La internalización de la clona SCV-ATCC27543 en las CEMB podría utilizar otros mecanismos de internalización también descritos para *S. aureus*, donde puede interactuar con receptores tipo Toll (TLR2/TLR6), lo que permite mediar la endocitosis de la bacteria (Alva-Murillo *et al.*, 2014). En soporte de esta hipótesis, existe un reporte de una SCV aislada de un caso un paciente con septicemia, la cual induce la expresión del ARNm de TLR2 en células epiteliales de pulmón NuLi-1 (Ou *et al.*, 2016).

Esta reportado que las SCVs de *S. aureus* recuperadas de humanos pueden persistir en células fagocíticas no profesionales (endotelio, fibroblasto, osteoblastos y queratinocitos) por largos periodos de tiempo sin ser detectadas por el sistema inmune (Dean *et al.*, 2014; Lannergard *et al.*, 2008; Kahl *et al.*, 1998). En este estudio se demostró que la clona SCV-ATCC27543 puede persistir hasta por 72 h en las CEMB sin provocar la lisis celular o apoptosis, a diferencia de lo observado para la cepa silvestre que induce apoptosis a partir de 1 h de infección (Figura 11 y 12). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado en CEMB infectadas por una SCV de *S. aureus* que persistió hasta por 15 h, disminuyendo la apoptosis hasta un 30% respecto a su cepa silvestre (Zhu *et al.*, 2016). Esta característica de persistencia es favorecida en las SCVs de *S. aureus* al presentar una atenuación de los factores de virulencia como en el sistema Agr, por lo cual no sintetizan proteínas de daño al tejido (ej. hemolisinas, proteína A), y de esta manera no activan la respuesta inflamatoria (Buzzola *et al.*, 2007). Aunado a esto, las SCVs de *S. aureus* tienen la capacidad de incrementar la expresión de genes de rutas de la arginina desaminasa, lo cual reduce la función de enzimas del hospedero involucradas en la respuesta inmune y esto es clave del éxito en la evasión de la misma (Vaudaux *et al.*, 2002); por lo que se podría sugerir que el éxito de la persistencia de la clona SCV-ATCC27543 en las CEMB se debe a que tiene disminuida la expresión de sus factores de virulencia, y a la modulación de algunas de las enzimas del hospedero que evita que sea detectada por su sistema inmune.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se propone un modelo que permite explicar por que la clona SCV-ATCC27543 puede persistir intracelularmente en las células de epitelio mamario bovino (Figura 13).

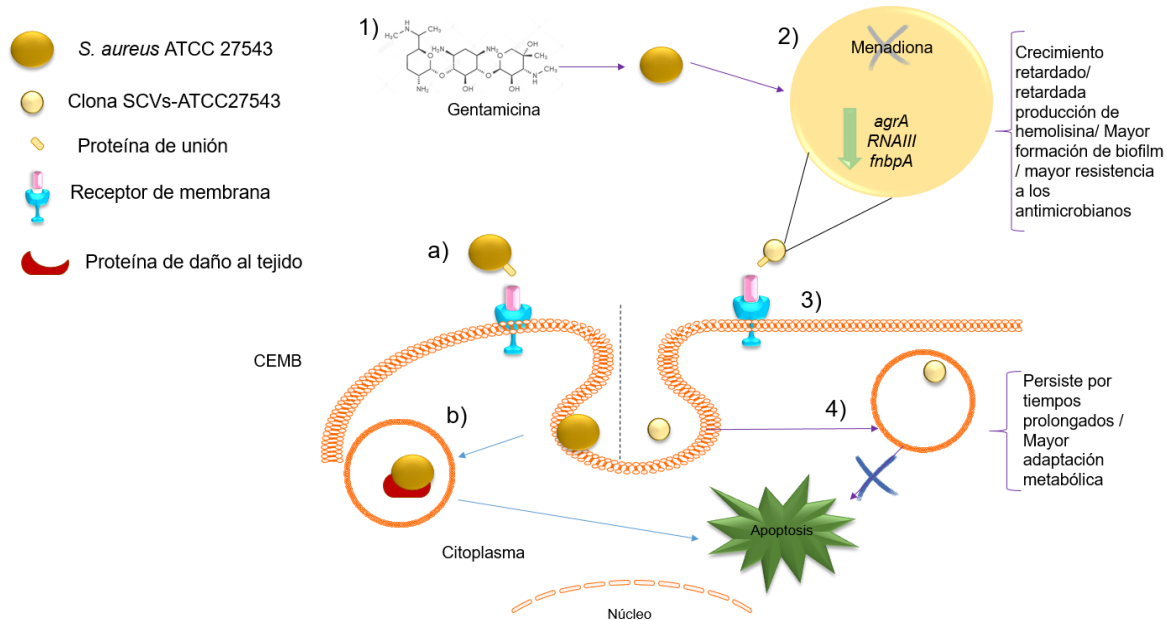


Figura 13. Mecanismo de persistencia de la clona SCV de *S. aureus* ATCC27543 en las CEMB. 1) *S. aureus* ATCC27543 al estar en condiciones de estrés, como la exposición a gentamicina, cambia su fenotipo a SCV-ATCC27543. **2)** La clona SCV-ATCC27543 presenta auxotrofismo a menadiona, una atenuación del sistema de virulencia Agr, en consecuencia presenta un crecimiento lento, hemólisis retardada, una mayor producción de biofilm y una mayor resistencia a los antimicrobianos. **3)** La clona SCV-ATCC27543 puede internalizarse en las CEMB. **4)** La clona SCV-ATCC27543 al tener disminuida la expresión de los factores de virulencia no es detectada por el sistema inmune ni induce apoptosis, además logra adaptarse a las condiciones intracelulares al tener una mayor adaptación al metabolismo de nutrientes, de esta manera logra persistir en las CEMB por largos periodos de tiempo. **a)** *S. aureus* ATCC27543 silvestre internaliza en las CEMB. **b)** *S. aureus* ATCC27543 silvestre expresa proteínas de daño al tejido, siendo detectado por el sistema inmune y provocando la apoptosis.

11. CONCLUSIÓN

Se generó y caracterizó una clona SCV de *S. aureus* ATCC27543, la cual es hemolítica reducida, no pigmentada, no fermenta manitol, presenta auxotrofia en menadiona y una atenuación en la expresión de los genes de virulencia del sistema Agr. De igual manera, presenta una amplia resistencia a los antimicrobianos, siendo una gran productora de biofilm, y con capacidad de internalizar, persistir y no inducir apoptosis en las CEMB.

12. REFERENCIAS

Acar, J.F., Goldstein F.W., & Lagrange P. (1978). Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *Jornual of Clinical Microbiology* ; 8(2):142–147.

Aitken, S. L., Corl, C. M., & Sordillo, L. M. (2011). Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 291–304. <http://doi.org/10.1007/s10911-011-9230-4>

Akiyama, H., Ueda, M., Kanzaki, H., Tada, J., & Jirô A. (1997). Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: Role of fibrinogen and fibrin. *Journal of Dermatological Science*, 16(1), 2–10. [http://doi.org/10.1016/S0923-1811\(97\)00611-7](http://doi.org/10.1016/S0923-1811(97)00611-7)

Alexander, E. H., & Hudson, M. C. (2001). Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1007/s002530100703>

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

Andreotti, C. S., Pereyra A. L. E., Sacco, S.C., Baravalle C., Renna, S.M., Ortega H.H., Calvinho, L. F., & Dalard, B. E. (2017). Proliferation- apoptosis balance in *Staphylococcus aureus* cronically infected bovine mammary glands during involution. *Jornual of Dairy Research*. 1-9.

Atalla, H., Wilkie, B., Gyles, C., Leslie, K., Mutharia, L., & Mallard, B. (2010). Antibody and cell-mediated immune responses to *Staphylococcus aureus* small colony variants and their parental strains associated with bovine mastitis. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(12), 1283–1290. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2010.07.005>

Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C. L., Moisan, H., Malouin, F., & Mallard, B. (2008). Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV)

associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(6), 785–799. <http://doi.org/10.1089/fpd.2008.0110>

Alva-Murillo, N., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2014). Nonprofessional phagocytic cell receptors involved in *Staphylococcus aureus* internalization. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/538546>

Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2013). Effects of sodium octanoate on innate immune response of mammary epithelial cells during *Staphylococcus aureus* internalization. *BioMed Research International*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/927643>

Balwit, J. M., Langevelde, P. Van, Vann, J. M., & Proctor, R. A. (1994). Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 170(4), 1033–1037. <http://doi.org/10.1093/infdis/170.4.1033>

Baumert, N., von Eiff, C., Schaaff, F., Peters, G., Proctor, R. A., & Sahl, H. G. (2002). Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Microbial Drug Resistance*, 8(1076-6294), 253–260. <http://doi.org/10.1089/10766290260469507>

Bhattacharyya, S., Roy, S., Mukhopadhyay, P., Rit, K., Dey, J., Ganguly, U., & Ray, R. (2012). Small Colony variants of *Staphylococcus aureus* isolated from a patient with infective endocarditis: a case report and review of the literature. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(2), 98–9.

Brakstad, O. G., Aasbakk, K., & Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1654–1660. Retrieved from <http://jcm.asm.org/cgi/content/long/30/7/1654>

Bui, L. M. G., Turnidge, J. D., & Kidd, S. P. (2015). The induction of

Staphylococcus aureus biofilm formation or Small Colony Variants is a strain-specific response to host-generated chemical stresses. *Microbes and Infection*, 17(1), 77–82. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.09.009>

Bustos-Martínez, J. A., Hamdan-Partida, A., & Marcia Gutiérrez-Cárdenas. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno. *Revista Biomedica*, 17(4), 287–305.

Buzzola, F. R., Alvarez, L. P., Tuchscher, L. P. N., Barbagelata, M. S., Lattar, S. M., Calvino, L., & Sordelli, D. O. (2007). Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse agr groups to invade mammary epithelial cells. *Infection and Immunity*, 75(2), 886–891. <http://doi.org/10.1128/IAI.01215-06>

Chatterjee, I., Herrmann, M., Proctor, R. A., Peters, G., & Kahl, B. C. (2007). Enhanced post-stationary-phase survival of a clinical thymidine-dependent small-colony variant of *Staphylococcus aureus* results from lack of a functional tricarboxylic acid cycle. *Journal of Bacteriology*, 189(7), 2936–2940. <http://doi.org/10.1128/JB.01444-06>

Clarke, S. R. & Foster, S. J. (2006). Surface adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Advances in microbial physiology*, 51 (2), 188-203.

Clements, M. O., Watson, S. P., Poole, R. K., & Foster, S. J. (1999). CtaA of *Staphylococcus aureus* is required for starvation survival, recovery, and cytochrome biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 501–507.

Coté- Gravel, J., Brouillette, E., & Talbot, B. G. (2016). Characterization of a vraG Mutant in a Genetically Stable *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variant and Preliminary Assessment for Use as a Live-Attenuated Vaccine against Intramammary Infections, 1–23. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0166621>

Dean, M. A., Olsen, R. J., Wesley Long, S., Rosato, A. E., & Musser, J. M. (2014).

Identification of point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* strains that produce small-colony variants auxotrophic for menadione. *Infection and Immunity*, 82(4), 1600–1605. <http://doi.org/10.1128/IAI.01487-13>

De Oliveira, A. P., Watts, J. L., Salmon, S. A., & Aarestrup, F. M. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 855–862. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74949-6](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74949-6)

du Preez, J. H. (2000). Bovine mastitis therapy and why it fails. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(3), 201–208. <http://doi.org/10.4102/jsava.v71i3.714>

Ferraro, L., Troya, H., & Scaramelli, A. (1999). Prevalencia de la mastitis subclinica bovina en venezuela y evaluación de la prueba de mastitis de calidornia (CMT) como prueba diagnostica. *Revista Científica FCV* 9(2), 84-90

Foster, T. J. (2004). *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, (12), 10–13. <http://doi.org/10.1172/JCI200422123.7>.

Gläser, R., Becker, K., von Eiff, C., Meyer-Hoffert, U., & Harder, J. (2014). Decreased Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants toward Human Antimicrobial Peptides. *The Journal of Investigative Dermatology*, (Figure 1), 3–6. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.176>

Gordon, C. P., Williams, P., & Chan, W. C. (2013). Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: A medicinal chemistry perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), 1389–1404. <http://doi.org/10.1021/jm3014635>

Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., López Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(1-2), 113–122. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.007>

Harris, L. G., & Richards, R. G. (2006). Staphylococci and implant surfaces: a review. *Journal of Care Injured*, 37(2 SUPPL.). <http://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.003>

Hauck, C. R., & Ohlsen, K. (2006). Sticky connections: Extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*, 9(1), 5–11. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2005.12.002>

Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M. A., Götz, F., Peters, G., & Heilmann, C. (2010). A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor. *Cellular Microbiology*, 12(12), 1746–1764. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01506.x>

Hoffmann, C., Ohlsen, K., & Hauck, C. R. (2011). Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *European Journal of Cell Biology*, 90(11), 891–896. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.03.001>

Hu, Q., Cui, X., Tao, L., Wang, T., & Wang, X. (2014). *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in primary bovine mammary epithelial cells through Fas-FADD death receptor-linked caspase 8 signaling. *DNA and Cell Biology*, 33(6), 388–397

Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., ... Nesme, X. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity*, 70(2), 631–641. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631>

Johns, B. E., Purdy, K. J., Tucker, N. P., & Maddocks, S. E. (2015). Phenotypic and Genotypic Characteristics of Small Colony Variants and Their Role in Chronic Infection. *Microbiology Insights*, 15–23. <http://doi.org/10.4137/MBI.S25800.TYPE>

Kahl, B. C. (2014). Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus* - A bacterial survival strategy. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 515–522. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.05.016>

Kahl, B., Herrmann, M., Everding, a S., Koch, H. G., Becker, K., Harms, E., ... Peters, G. (1998). Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(4), 1023–1029. <http://doi.org/10.1086/515238>

Kerro Dego, O., van Dijk, J. E., & Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *The Veterinary Quarterly*, 24(4), 181–198. <http://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695135>

Klein, R. C., Fabres-Klein, M. H., Brito, M. A. V. P., Fietto, L. G., & Ribon, A. de O. B. (2012). *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Veterinary Microbiology*, 160(1-2), 183–188. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.025>

Kim, Y., Atalla, H., Mallard, B., Robert, C., & Karrow, N. (2011). Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 51. <http://doi.org/10.1186/1746-6148-7-51>

Kriegeskorte, A., Grubmaller, S., Huber, C., Kahl, B. C., von Eiff, C., Proctor, R. A., ... Becker, K. (2014). *Staphylococcus aureus* small colony variants show common metabolic features in central metabolism irrespective of the underlying auxotrophism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(October), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00141>

Krismer, & peschel. (2011). does SA nasal colonization involve biofilm formation?, 489–493. Retrieved from <http://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/fmb.11.37>

Labbé, K. & Saleh, M. (2011). Pyroptosis: a caspase- 1 dependent programmed

cell death and barrier to infection. *Progress in inflammation Research*, 17-36.

Lannergård, J., Von Eiff, C., Sander, G., Cordes, T., Seggewiß, J., Peters, G., ... Hughes, D. (2008). Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 4017–4022. <http://doi.org/10.1128/AAC.00668-08>

Lee, S.M., and Kleiboeker, S.B., 2007. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology* 365, 419–434.

López Meza, J. E., Higuera Ramos, J. E., Ochoa Zarzosa, A., Chassin Noria, O., Valdez Alarcón, J. J., Bravo Patiño, A., & Baizabal Aguirre, V. M. (2006). Caracterización molecular de aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina en Tarímbaro, Michoacán. *Tecnología Pecuaria México*, 44(1), 91–106. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1455402>

Looney, W. J. (2000). Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, 57(4), 317–322. <http://doi.org/Doi 10.1086/498753>

Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 339(8), 520–532. <http://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>

.

Magro, G., Brevini, T. A. L., De Maglie, M., Minozzi, G., Scanziani, E., & Piccinini, R. (2017). An explant of heifer mammary gland to study the immune response of the organ. *Research in Veterinary Science*, 114, 44–50. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.002>

Manna, A. C., Ballal, A., & Ray, B. (2009). sarZ, a sarA family gene, is transcriptionally activated by MgrA and is involved in the regulation of genes encoding exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1656–1665. <http://doi.org/10.1128/JB.01555-08>

Martino, D. L., Marfe', G., Longo, M., Fiorito, F., Montagnaro, S., Iovane, V., et al. (2010). Bid cleavage, cytochrome c release and caspase activation in canine coronavirus-induced apoptosis. *Veterinary Microbiology* 141, 36–45

Melter, O., & Radojevič, B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia Microbiologica*, 55(6), 548–558. <http://doi.org/10.1007/s12223-010-0089-3>

Millogo, V. (2010). Milk Production of Hand-Milked Dairy Cattle in Burkina Faso. *African Journal of Agricultural Research*, 3(3), 215-224.

Mitchell, G., Fugère, A., Pépin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E. H., Cantin, A. M., & Malouin, F. (2013). SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants. *PLoS ONE*, 8(5), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0065018>

Morey, J. S., Ryan, J. C., & Van Dolah, F. M. (2006). Microarray validation: Factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological Procedures Online*, 8(1), 175–193. <http://doi.org/10.1251/bpo126>

Neut, D., van der Mei, H. C., Bulstra, S. K., & Busscher, H. J. (2007). The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthopaedica*, 78(3), 299–308. <http://doi.org/10.1080/17453670710013843>

Novick, R. P., (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1429–1449. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526>.

Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., & Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *The EMBO Journal*, 12(10), 3967–3975. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.09.003>

Ochoa-Zarzosa, A., Villarreal-Fernández, E., Cano-Camacho, H., & López-Meza, J. E. (2009). Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microbial Pathogenesis*, 47(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2009.04.006>

Onyango, L.A., Hugh-Dunstan R., Roberts, T.K., Macdonald, M.M., & Gottfries, J. (2013). Phenotypic Variants of Staphylococci and Their Underlying Population Distributions Following Exposure to Stress. *PLoS ONE* 8(10): e77614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077614>

Ou, J. J. J., Drilling, A. J., Cooksley, C., Bassiouni, A., Kidd, S. P., Psaltis, A. J., ... Vreugde, S. (2016). Reduced Innate Immune Response to a *Staphylococcus aureus* Small Colony Variant Compared to Its Wild-Type Parent Strain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(December), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00187>

Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54(4), 399–409. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.06.010>

Pader, V., James, E. H., Painter, K. L., Wigneshweraraj, S., & Edwards, A. M. (2014). The Agr quorum-sensing system regulates fibronectin-binding but not hemolysis in the absence of a functional electron transport chain. *Infection and Immunity*, 82(August), 4337–4347. <http://doi.org/10.1128/IAI.02254-14>

Painter, K. L., Strange, E., Parkhill, J., Bamford, K. B., Armstrong-James, D., & Edwards, A. M. (2015). *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H₂O₂-resistant small colony variants via the SOS response. *Infection and Immunity*, 83(5), IAI.03016–14. <http://doi.org/10.1128/IAI.03016-14>

Pahissa, A., (2009). Microbiología y patogenia de las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. De cueto, M., Pascual, Á., Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* (pp. 17-21) Barcelona, España: Marge medical books.

Proctor, R. A., von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M., & Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1740-1526 (Print)), 295–305. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1384>

Proctor, R. A., & von Humboldt, A. (1998). Bacterial energetics and antimicrobial resistance. *Drug Resistance Updates*, 1(4), 227–235. [http://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80003-4](http://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80003-4)

Proctor, R. a, Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P. E., Lew, D. P., & Peters, G. (1998). Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 27 Suppl 1(1058-4838 SB - IM), S68–S74. <http://doi.org/10.1086/514906>

Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., & Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(July), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00099>

Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P., & Sahl, H. G. (2003). Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(1438-4221), 427–435. <http://doi.org/10.1078/1438-4221-00282>

Schröder, A., Kland, R., Peschel, A., Von Eiff, C., & Aepfelbacher, M. (2006). Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: Small colony variants are able to survive in lysosomes. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(4), 185–194. <http://doi.org/10.1007/s00430-006-0015-0>

Sendi, P., & Proctor, R. a. (2009). *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends in Microbiology*, 17(2), 54–58. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.004>

Silva, S., Costa, E. M., Horta, B., Calhau, C., Morais, R. M., & Pintado, M. M. (2016). Anti-biofilm potential of phenolic acids: the influence of environmental pH and intrinsic physico-chemical properties. *The journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 32(8), 853–860. <http://doi.org/10.1080/08927014.2016.1208183>

Soichi, F., Yuko, A., George, A., Hirokazu O., & Yasushi, M. (2009). Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. *Journal of food Microbiology*, 138(1-2): 176–180. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.026.

Sobral, R. G., Jones, A. E., Des Etages, S. G., Dougherty, T. J., Peitzsch, R. M., Gaasterland, T., ... Tomasz, A. (2007). Extensive and genome-wide changes in the transcription profile of *Staphylococcus aureus* induced by modulating the transcription of the cell wall synthesis gene murF. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2376–2391. <http://doi.org/10.1128/JB.01439-06>

Somerville, G. a, & Proctor, R. a. (2009). At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in Staphylococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 73(2), 233–248. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00005-09>

Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., & Arrow, A. S. (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51(4), 439–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3325794> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC373126>

Trouillet, S., Rasigade, J. P., Lhoste, Y., Ferry, T., Vandenesch, F., Etienne, J., & Laurent, F. (2011). A novel flow cytometry-based assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* adhesion to and invasion of eukaryotic cells. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 145–149. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.012>

Tuchscher, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pförtner, H., Niemann, S., ... Löffler, B. (2015). Sigma Factor SigB Is Crucial to Mediate *Staphylococcus aureus* Adaptation during Chronic Infections. *PLOS Pathogens*, 11(4), e1004870. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004870>

Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J., ... Von Eiff, C. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infection and Immunity*, 70(10), 5428–5437. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5428-5437.2002>

Vesga, O., Groeschel, M. C., Otten, M. F., Brar, D. W., Vann, J. M., & Proctor, R. a. (1996). *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *The Journal of Infectious Diseases*, 173(3), 739–742. <http://doi.org/10.1093/infdis/173.3.739>

Vestergaard, M., Paulander, W., Leng, B., Nielsen, J. B., Westh, H. T., & Ingmer, H. (2016). Novel pathways for ameliorating the fitness cost of gentamicin resistant small colony variants. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01866>

Von Eiff, C., Peters, G., & Becker, K. (2006). The small colony variant (SCV) concept—the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury*, 37(2 SUPPL.), 26–33. <http://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.006>

Vuong, C., Saenz, H. L., Götz, F., & Otto, M. (2000). Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(6), 1688–1693. <http://doi.org/10.1086/317606>

Wang, C., & Zhu, J. (2017). HPLC–MS/MS targeted metabolic profiling reveals distinct metabolic profiles from *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1060(March), 340–346. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.027>

Yin, X.M. (2000). Signal transduction mediated by Bid, a prodeath Bcl-2 family

proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Reseach*, 10,161-167

Zhu, L., Zou, F., Yan, Y., Wang, Q., Shi, Y., & Qu, W. (2016). The Characteristics of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variant Isolated from Chronic Mastitis at a Dairy Farm in Yunnan Province, *The Scientific Word Journal*,(Table 1), 1–9. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9157605>