



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Orientación Genética Microbiana

Trabajo final

**“Respuesta inmune específica en vaquillonas inmunizadas
con la cepa mutante avirulenta *Staphylococcus aureus*
RC122: determinación de anticuerpos específicos y su
capacidad opsónica”**

Carolina Belén García

Año 2008



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología
Orientación Genética Microbiana

Trabajo final

**“Respuesta inmune específica en vaquillonas inmunizadas con
la cepa mutante avirulenta *Staphylococcus aureus* RC122:
determinación de anticuerpos específicos y su capacidad
opsónica”**

Carolina Belén García

Año 2008

Trabajo final

Año 2008

“Respuesta inmune específica en vaquillonas inmunizadas con la mutante avirulenta *Staphylococcus aureus* RC122: determinación de anticuerpos específicos y su capacidad opsónica”

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología, orientación Genética Microbiana, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al título de Microbiólogo de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Alumna: Carolina Belén García

Directora: Dra. Cristina Bogni

Co-director: Mic. Matías S. Pellegrino

Tribunal Evaluador

.....
Dra. Cristina Bogni

.....
Dra. Nora Bensi

.....
Dra. Elizabeth Witowski

Agradecimientos

A mi mamá; aquella persona maravillosa, por su amor INCONDICIONAL, mi guía, mi consejera, que siempre confió en mí, que me inculcó los valores necesarios para conducirme en esta vida nada fácil, que siempre encuentra el lado positivo de las cosas...

A mis hermanos: Luciana, Ana Paula, Gastón y Betiana; también incondicionales, únicos, por "aguantarme TODAS mis locuras", por sus peleas y retos, su confianza, por su amor...

A mis pichones: Francisco, Catalina, Bruno, Alejo, Milagros y Ezequiel; por alegrarme la vida y brindarme ese amor y sonrisas tan sinceras...

A mis cuñados: Guillermo, Gustavo, Nadia y Marcos; hermanos postizos que me cuidaron y guiaron desde chiquita...

A Laura y su familia; mi familia del alma...

A Chela; mi tía...

A Rafael; por su paciencia y por tantos momentos compartidos...

A Evelin; mi hermana del corazón...

A mis amigas, "las locas de mi alma", y amigos; cada uno tan particular...

A mis compañeros...

A mis amigas de la academia...

A Laurita y Mari, Susy, Ceci y Dani; por tantas charlas, consejos y conocimientos compartidos...

A Matías, Cristina, Claudia, Liliana y Mirta; por sus enseñanzas de vida y de ciencia...

A Elizabeth y Norita; mis jurados...

Al personal del Dpto. de Microbiología e Inmunología, por su apoyo y dedicación...

A todos los educadores que me formaron durante estos 5 años de estudio...

En fin...

A aquellos que siempre están presentes...

A aquellos que están ocasionalmente...

A aquellos que en algún momento se cruzaron en mi camino...

A aquellos que jamás estuvieron...

A todos los que aportaron su granito o montaña de arena...

Simplemente GRACIAS....

“La vida”

*Después de algún tiempo aprenderás
la diferencia entre dar la mano
y socorrer a un alma,
y aprenderás que amar
no significa apoyarse,
y que compañía no siempre
significa seguridad.*

*Comenzarás a aprender que los besos
no son contratos, ni regalos,
ni promesas...*

*Comenzarás a aceptar tus derrotas
con la cabeza erguida y la mirada al frente,
con la gracia de un niño y no con la tristeza de un adulto
y aprenderás a construir hoy todos tus caminos,
porque el terreno de mañana es incierto
para los proyectos,
y el futuro tiene la costumbre de caer en el vacío.*

*Después de un tiempo aprenderás
que el sol quema si te expones
demasiado...*

*Aceptarás incluso que las personas buenas
podrían herirte alguna vez,
y necesitarás perdonarlas ...*

*Aprenderás que hablar
puede aliviar los dolores del alma...*

*Descubrirás que lleva años construir confianza,
y apenas unos segundos destruirla,
y que tú también podrás hacer cosas
de las que te arrepentirás el resto de la vida.*

*Aprenderás que las buenas amistades continúan creciendo
a pesar de las distancias,
y que no importa qué es lo que tienes, sino a quién tienes en la vida,
y que los buenos amigos son la familia que nos permitimos elegir.*

*Aprenderás que no tenemos que cambiar de amigos,
si estamos dispuestos a aceptar que los amigos cambian.*

Te darás cuenta de que puedes pasar buenos momentos con tu mejor amigo haciendo cualquier cosa o simplemente nada, sólo por el placer de disfrutar su compañía.

Descubrirás que muchas veces tomas a la ligera a las personas que más te importan, por eso siempre debemos decir a estas personas que las amamos, porque nunca estaremos seguros de cuándo será la última vez que las veamos.

Aprenderás que las circunstancias y el ambiente que nos rodea tienen influencia sobre nosotros, pero nosotros somos los únicos responsables de lo que hacemos.

Comenzarás a aprender que no nos debemos comparar con los demás, salvo cuando queramos imitarlos para mejorar.

Descubrirás que lleva mucho tiempo llegar a ser la persona que quieres ser, y que el tiempo es corto.

Aprenderás que no importa a donde llegaste, sino a dónde te diriges y si no lo sabes, cualquier lugar sirve...

Aprenderás que si no controlas tus actos, ellos te controlarán, y que ser flexible no significa ser débil o no tener personalidad, porque no importa cuán delicada y frágil sea una situación: siempre existen dos lados.

Aprenderás que héroes son las personas que hicieron lo que era necesario, enfrentando las consecuencias... Aprenderás que la paciencia requiere mucha práctica.

Descubrirás que algunas veces, la persona que esperas que te patee cuando te caes, tal vez sea una de las pocas que te ayuden a levantarte.

Madurar tiene más que ver con lo que has aprendido de las experiencias que con los años vividos.

Aprenderás que hay mucho más de tus padres en ti de lo que supones.

*Aprenderás que nunca se debe decir a un niño
que sus sueños son tonterías,
porque pocas cosas son tan humillantes y sería una tragedia si lo creyese
porque le estarías quitando la esperanza.*

*Aprenderás que cuando sientes rabia,
tienes derecho a tenerla,
pero eso no te da derecho a ser cruel.*

*Descubrirás que sólo porque alguien no te ama de la forma que quieres,
no significa que no te ame con todo lo que puede,
porque hay personas que nos aman,
pero no saben cómo demostrarlo...*

*No siempre es suficiente
ser perdonado por alguien,
algunas veces tendrás que aprender a perdonarte a ti mismo.*

*Aprenderás que con la misma severidad con que juzgas,
también serás juzgado
y en algún momento, condenado.*

*Aprenderás que no importa
en cuantos pedazos tu corazón se partió,
el mundo no se detiene para que lo arregles.*

*Aprenderás que el tiempo no es algo que pueda volver hacia atrás,
por lo tanto, debes cultivar tu propio jardín y decorar tu alma,
en vez de esperar que alguien te traiga flores.*

*Entonces y sólo entonces,
sabrás realmente lo que puedes soportar,
que eres fuerte y podrás ir mucho más lejos de lo que pensabas
cuando creías que no se podía más.*

*Es que realmente la vida vale
cuando tienes el valor de enfrentarla!*

Jorge Luis Borges

Resumen

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que mayores pérdidas económicas a nivel mundial causa al productor y a la industria lechera, especialmente en las regiones con una producción intensiva. Aunque en Argentina no existen estadísticas actualizadas acerca de las pérdidas económicas, se estima que superan los \$220 millones por año, que se deben no solamente a una marcada disminución en la producción, descarte de leche, a gastos de control y tratamiento, sino también a la reducción en el valor biológico y pérdida de potencial genético.

Staphylococcus aureus es el principal agente causal de la mastitis bovina.

La vacunación representa una estrategia importante para el control de la mastitis, ya que su objetivo principal es incrementar la concentración de anticuerpos opsonicos en sangre y en leche contra un determinado microorganismo, de manera de inhibir su crecimiento y producción de toxinas.

Estudios realizados en el laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC permitieron la obtención y caracterización de una mutante avirulenta de *S. aureus*, designada RC122. Esta mutante obtenida por mutagénesis con nitrosoguanidina, mostró un menor tamaño de colonia, una marcada disminución de la virulencia (1350 veces menor) en modelo de ratón, crecimiento lento y disminución en la síntesis de varias exotoxinas tales como α y β hemolisinas, DNAsa y coagulasa con respecto a la cepa parental RC108.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la potencialidad de la mutante avirulenta *Staphylococcus aureus* RC122 como cepa viva atenuada en un ensayo de protección, para ser utilizada como cepa vacunal contra la mastitis bovina.

Para el ensayo de vacunación se seleccionaron nueve vaquillonas Holando Argentino, las cuales se asignaron a dos grupos de 5 y 4 animales, constituyendo los grupos vacunado (GV) y no vacunado (GNV), respectivamente. El esquema de vacunación involucró la administración de 4 dosis al GV: las tres primeras en forma subcutánea (SC) 30 días antes de la preñez, 30 días después de la preñez y 10 días antes del parto, y la cuarta en forma intramamaria (IM) 20 días después del parto. Con las dosis SC se pretende aumentar la producción de anticuerpos específicos en sangre en las vaquillonas al momento del parto (período de mayor susceptibilidad a la enfermedad), mientras que el fin de la dosis IM sería la de estimular el pasaje de anticuerpos específicos de la sangre a la leche para favorecer la fagocitosis. El GNV fue tratado de igual manera con un placebo. Este esquema también involucró el desafío de todos los animales (GV y GNV) con la cepa virulenta parental RC108 40 días después del parto (20 días después de la dosis IM), con el fin de evaluar la

capacidad protectora de la vacuna frente a la infección con *S. aureus*. A diferentes tiempos se tomaron muestras de sangre y leche. Se llevó a cabo la determinación del recuento de células somáticas (RCS), la bacteriología de las muestras de leche después del desafío y los de casos de mastitis clínicas y subclínicas (Pellegrino, 2007). En el presente trabajo se evaluó:

- ✓ Reactividad de los sueros de vacas vacunadas frente a la cepa avirulenta y a diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y bovinos, como una forma de estimar si existe reacción cruzada entre los anticuerpos específicos contra la cepa RC122 y cepas heterólogas.
- ✓ Niveles de anticuerpos específicos (IgG específica, IgG₁, IgG₂, IgM e IgA) en muestras de sangre y leche de animales vacunados y no vacunados.
- ✓ Capacidad opsónica de los sueros obtenidos de vacas inmunizadas mediante ensayos de fagocitosis con leucocitos PMN bovinos, con el objeto de establecer algún grado de relación entre la disminución de bacterias en leche en el grupo vacunado y la producción de anticuerpos específicos.

Los resultados obtenidos mostraron que, durante el ensayo de protección realizado, los animales del GV presentaron mayores niveles de anticuerpos opsónicos que aquellos animales no inmunizados. Esto quedó demostrado cuando todos los animales (GV y GNV) fueron desafiados con la cepa parental virulenta. Las vacas vacunadas llegaron al parto con un mayor título de anticuerpos en sangre generados por el estímulo sistémico. Además, antes de la aplicación de la D4, los animales vacunados presentaron títulos significativamente mayores de anticuerpos en leche, con lo cual la administración de esta última dosis de vacuna no tendría un efecto considerable. Por otro lado, cuando las vacas de ambos grupos fueron desafiadas, se pudo observar que las vacunadas presentaron un menor porcentaje de infección. También se observó un índice de fagocitosis (IF) por neutrófilos PMN bovinos significativamente mayor en sueros de sangre y leche del GV, no sólo en los ensayos realizados con la cepa vacunal, sino también para la cepa parental y cepas heterólogas de origen bovino y humano.

Podemos concluir que el esquema de vacunación utilizado, empleando la mutante avirulenta *S. aureus* RC122 como inmunógeno, genera una respuesta inmunológica elevada en sangre y leche de vaquillonas del GV, dada por un aumento de los niveles de anticuerpos opsónicos, lo cual favorece la fagocitosis por parte de neutrófilos PMN bovinos, principal barrera de defensa contra patógenos intramamarios bovinos.

Abreviaturas

- ✓ ANOVA: modelo mixto para análisis de la varianza.
- ✓ BHI: caldo infusión cerebro corazón.
- ✓ ClfA: cumpling factor A.
- ✓ CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.
- ✓ D1: primera dosis de vacuna SC.
- ✓ D2: segunda dosis de vacuna SC.
- ✓ D3: tercera dosis de vacuna SC.
- ✓ D4: dosis de vacuna IM.
- ✓ DE: desvío estándar.
- ✓ Df: desafío.
- ✓ DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- ✓ DO: densidad óptica.
- ✓ EE: error estándar.
- ✓ ELISA: enzyme-linked inmunosorbent assay.
- ✓ ETA-ETB: toxina exfoliativa A - toxina exfoliativa B.
- ✓ FITC: isotiocianato de fluoresceína.
- ✓ FnBPA- FnBPB: subunidades A y B de la proteína de unión a la fibronectina.
- ✓ GNV: grupo no vacunado
- ✓ GV: grupo vacunado.
- ✓ IF: índice de fagocitosis.
- ✓ Ig: inmunoglobulina.
- ✓ IIM: infecciones intramamarias.
- ✓ IL-2: interleuquina 2.
- ✓ IM: intramamaria.
- ✓ LPS: lipopolisacárido.
- ✓ n: tamaño de muestra.

- ✓ NK: natural killer.
- ✓ P: parto.
- ✓ PMN: polimorfonucleares.
- ✓ Pr: preñez.
- ✓ RCS: recuento de células somáticas.
- ✓ SC: subcutánea.
- ✓ SCN: estafilococos coagulasa negativos.
- ✓ T10-T16: muestras de leche tomadas a diferentes tiempos.
- ✓ Ts0-Ts8: muestras de sangre tomadas a diferentes tiempos.
- ✓ TSB: caldo tripticasa soya.
- ✓ TSST-1: toxina de shock tóxico 1.
- ✓ ufc: unidades formadoras de colonia.

Índice

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades	17
2. Mastitis	18
2.1. Formas clínicas de presentación	19
2.2. Etiología	20
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.1. Características generales	22
3.2. Patogenia: Desarrollo de la enfermedad	23
3.2.1. Invasión del pezón	23
3.2.2. Establecimiento de la infección e inflamación del área dañada	23
3.2.3. Destrucción del tejido alveolar	24
4. Inmunología de la glándula mamaria	25
4.1. Defensas anatómicas	25
4.2. Defensas celulares	26
4.3. Defensas solubles	27
4.4. Recuento de células somáticas (RCS)	30
5. Diagnóstico	31
6. Transmisión, prevención y control	32
7. Vacunas	37
7.1. Vacunas basadas en componentes de la pared celular	37
7.2. Vacunas basadas en exopolisacáridos capsulares	38
7.3. Vacunas a DNA	39
7.4. Vacunas basadas en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
7.4.1. Vacunas particuladas	40
7.4.2. Vacunas con cepas vivas avirulentas	40
8. <i>Staphylococcus aureus</i> RC122	41

HIPÓTESIS

Hipótesis	44
-----------	----

OBJETIVOS

Objetivo general	46
Objetivos específicos	46

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Cepas bacterianas	46
1.2. Animales de experimentación	46
1.3. Muestras biológicas	46
1.4. Medios de cultivo	46
1.5. Soluciones y reactivos para ELISA	47
1.6. Anticuerpos comerciales	47
1.7. Soluciones y reactivos para ensayos de fagocitosis	48

2. Métodos

2.1. Toma de muestra	50
2.1.1. Muestras de sangre	50
2.1.2. Muestras de leche	50
2.2. Determinación de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas en suero de sangre y leche de vacas vacunadas y controles mediante la técnica de ELISA	51
2.2.1. Preparación del antígeno	51
2.2.2. Tratamiento de la policubeta	51
2.2.3. Sensibilización de la policubeta	51
2.2.4. Bloqueo de la policubeta	51
2.2.5. Cuantificación de los anticuerpos	51
2.3. Determinación de la capacidad opsónica de sueros de vacas vacunadas y controles mediante ensayos de fagocitosis con PMN bovinos	52
2.3.1. Marcado bacteriano con isotiocianato de fluoresceína (FITC) isómero 1	52
2.3.2. Aislamiento de neutrófilos PMN bovinos	52
2.3.3. Determinación del número de neutrófilos (Recuento de neutrófilos totales)	53
2.3.4. Determinación de la viabilidad de neutrófilos	53
2.3.5. Ensayo de fagocitosis	53
2.4. Análisis estadístico	54

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Esquema de vacunación	58
2. Determinación de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas en sangre de vacas vacunadas y controles mediante la técnica de ELISA	58
2.1. IgG específica	58
2.2. IgG ₁ e IgG ₂	60
2.3. IgM e IgA	62
3. Determinación de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas en leche de vacas vacunadas y controles mediante la técnica de ELISA	63
3.1. IgG específica	63
3.2. IgG ₁ e IgG ₂	64
3.3. IgM e IgA	66
4. Determinación de reactividad cruzada de anticuerpos anti-RC122 frente a diferentes cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	67
5. Determinación de la capacidad opsónica de sueros de vacas vacunadas y controles mediante ensayos de fagocitosis con PMN bovinos	68
5.1. Fagocitosis de <i>Staphylococcus aureus</i> RC122 por PMN bovinos	68
5.2. Fagocitosis con PMN bovinos frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de diferentes orígenes	69
5.3. Determinación de la capacidad opsónica de sueros de leche de vacas vacunadas y controles mediante ensayos de fagocitosis con PMN bovinos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> RC122	71

CONCLUSIÓN

Conclusión	73
------------	----

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía	75
--------------	----

Introducción

Hipótesis

- ✓ El esquema de vacunación propuesto con la cepa mutante avirulenta *Staphylococcus aureus* RC122 permite la producción de elevados niveles de anticuerpos en sangre y leche de vaquillonas vacunadas respecto de aquellas no vacunadas.
- ✓ La vacunación con la cepa mutante avirulenta *Staphylococcus aureus* RC122 induce en sangre y leche de vaquillonas vacunadas un aumento de los niveles de IgG₂, lo cual favorece la fagocitosis por parte de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) bovinos.
- ✓ Los anticuerpos producidos durante la vacunación reaccionan frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes.

Objetivos

Objetivo general

- ✓ Evaluar la potencialidad de la mutante avirulenta *Staphylococcus aureus* RC122 para ser utilizada como cepa vacunal contra la mastitis bovina.

Objetivos específicos

- ✓ Determinar los niveles de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas (IgG específica, IgG₁, IgG₂, IgM e IgA) en muestras de sangre y leche de animales vacunados y no vacunados.
- ✓ Determinar la reactividad de los sueros de vacas vacunadas frente a diferentes cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y animales.
- ✓ Determinar la capacidad opsónica de los sueros obtenidos de vacas inmunizadas, por ensayos de fagocitosis con neutrófilos polimorfonucleares (PMN) bovinos.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron:

1.1.1. *S. aureus* RC108 (parental virulenta): marcada en el laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC con resistencia a estreptomicina (Sm^r), derivada de la cepa RC18 aislada de una vaca con mastitis subclínica en un tambo de la región centro-sur de la provincia de Córdoba, Argentina (Rampone y col., 2003).

1.1.2. *S. aureus* RC122 (mutante avirulenta): derivada de la cepa parental RC108 después de mutagénesis con nitrosoguanidina (Bogni y col., 1998).

1.1.3. *S. aureus* B1, B2 y B3, aisladas de casos de mastitis clínica de tres tambos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (Reinoso y col., 2002).

1.1.4. *S. aureus* H1, H2 y H3, aisladas de humanos (Reinoso y col., 2002).

1.1.5. *S. aureus* 95-1 y 547-1, aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica.

1.1.6. *S. aureus* Smith, cepa patógena y capsulada, aislada de humanos.

1.2. Animales de experimentación

Vaquillonas Holando Argentino de 16-18 meses de edad, hijas del mismo padre.

1.3. Muestras biológicas

Sueros sanguíneos y sueros de leche obtenidos en diferentes tiempos durante el ensayo de protección (figura 6).

1.4. Medios de cultivos y drogas

Los materiales utilizados en cada uno de los ensayos fueron de grado analítico de las marcas Bio-Rad, Britania, Cicarrelí, Mallinckrodt, Merck, Oxoid, Reidel- Del Haen, Serotec y Sigma.

1.4.1. Caldo Tripticasa Soya (TSB).

1.4.2. Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).

Los medios de cultivo empleados fueron preparados según las recomendaciones del fabricante y se agregó agar a razón de 15 gr/L a los caldos cuando fue necesario obtener medios sólidos.

1.5. Soluciones y reactivos para ELISA

1.5.1. Solución de glutaraldehído: al 0.025% en buffer $\text{CO}_3^{=}$ 0.05M pH 9.6.

1.5.2. PBS 0,1M pH 7,4: $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ (1M) 77.4mL, NaPO_4H_2 (0.5M) 45.2ml, agua destilada c.s.p. 1000mL.

1.5.3. Solución de bloqueo: PBS 0.1M pH 7.4, Tween 20 al 0.05%, leche descremada al 2% (Skim milk powder).

1.5.4. Solución de lavado: PBS 0.1M pH 7.4, Tween 20 al 0.05%.

1.5.5. Solución de stop: NaCl 0.4N.

1.5.6. Buffer $\text{CO}_3^{=}$ 0.05M pH 9.6:

Solución A: NaHCO_3 (0.1M).

Solución B: NaCO_3 (0.1M).

1.5.7. Reactivo de revelado (para la determinación de anticuerpos por ELISA): Diethanolamina buffer (5X) 1mL, agua destilada 4mL y 1 tableta de p-Nitrophenilphosphato.

1.6. Anticuerpos Comerciales

1.6.1. IgG monoclonal, anti-bovino, producida en ratón y conjugada con fosfatasa alcalina.

1.6.2. IgG monoclonal, anti-ratón, producida en conejo y conjugada con fosfatasa alcalina.

1.6.3. IgG₁ monoclonal, anti-bovino, producida en ratón.

1.6.4. IgG₂ monoclonal, anti-bovino, producida en ratón.

1.6.5. IgM monoclonal, anti-bovino, producida en ratón.

1.6.6. IgA monoclonal, anti-bovino/ovino, producida en ratón.

1.7. Soluciones y reactivos para ensayos de fagocitosis

1.7.1. FITC / NaHCO₃ 0.1mg/ml:

NaHCO₃ 0.1M pH 9.

Stock FITC 10mg/ml de NaHCO₃.

Solución de trabajo FITC 0.1mg/mL de NaHCO₃.

1.7.3. Solución de Rojo Fenol 0.4%: Rojo Fenol 1g, NaOH 1N diluido 1/20, agua destilada c.s.p. 250mL.

1.7.2. Solución de Hanks stock 10X

Solución A:

1. NaCl 80g, SO₄Mg+7H₂O 2g, ClK 4g, agua destilada c.s.p. 400mL.

2. Cl₂Ca 1.4g y agua destilada c.s.p. 50mL.

Mezclar las soluciones 1 y 2, y llevar a Vf: 500mL con agua destilada en un matraz aforado.

Solución B:

Na₂HPO₄+12H₂O 1.52g, KH₂PO₄ 0.6g, glucosa anhidra 10g, agua destilada c.s.p. 400mL.

Agregar 50mL de la solución de Rojo Fenol 0.4%, y llevar a Vf: 500mL en un matraz aforado.

Transferir las soluciones A y B por separado a frascos Roux de 1000mL.

Esterilizar por separado en autoclave a ¾ atm. durante 25min. Enfriar y mezclar ambas soluciones.

1.7.5. Solución de Hanks de trabajo 1X: solución de Hanks 10X 50mL, agua destilada c.s.p. 500mL. Neutralizar con 1.25mL de NaHCO₃ 2.8% por cada 100mL de solución de Hanks 1X.

1.7.6. Solución de Turk: ácido acético al 5% (agregar azul de metileno al 1% al momento de usar).

1.7.7. Solución de Azul Tripán: azul tripán 0.2% P/V (mezclar 4 partes del colorante con una parte de NaCl 4.5% al momento de usar).

1.7.8. Solución de May Grünwald-Giemsa.

1.7.9. ACD (ácido-citrato dextrosa solución 2X): citrato trisódico 8.8g, ácido cítrico 3.2g, dextrosa 10g, agua demonizada c.s.p 200mL.

1.7.10. Na₂HPO₄ 0.15M.

1.7.11. KH_2PO_4 0.15M.

1.7.12. PBS: Na_2HPO_4 0.15M 56mL, KH_2PO_4 0.15M 12mL, NaCl 8.76mL, agua destilada c.s.p 1000mL. Ajustar a pH 7.2 con KH_2PO_4 0.15M.

1.7.13. Solución de lisado: Na_2HPO_4 0.15M 40mL, KH_2PO_4 0.15M 9mL, agua destilada c.s.p 1000mL. Ajustar a pH 7.2 con KH_2PO_4 0.15M.

1.7.14. Solución de restauración: Na_2HPO_4 0.15M 4mL, KH_2PO_4 0.15M 0.9mL, NaCl 2.7mL, agua destilada c.s.p 200mL. Ajustar a pH 7.2 con KH_2PO_4 0.15M.

1.7.15. Solución de NaCl 0.85%-EDTA 0.04%.

1.7.16. Solución de Azul de metileno 1%.

2. MÉTODOS

2.1. Toma de muestra

A distintos tiempos se tomaron muestras de sangre (Ts0-Ts8) y de leche (T10-T16) (figura 6).

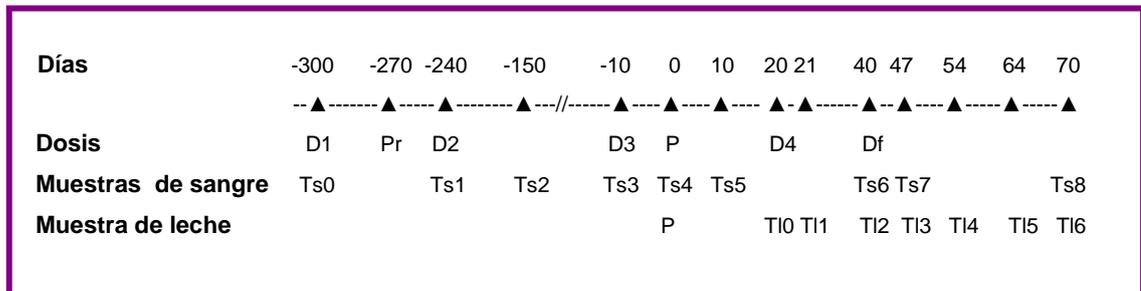


Figura 6: Esquema de vacunación y toma de muestras de sangre y leche de vaquillonas pertenecientes al ensayo de protección. D1, D2 y D3: primera, segunda y tercera dosis de vacuna SC D4: dosis de vacuna IM Pr: preñez. P: parto. Df: desafío. Ts0-Ts8: muestras de sangre. T10-T16: muestras de leche.

2.1.1. Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de la vena de la cola, colocadas en tubos estériles conteniendo EDTA, centrifugadas, y el suero fraccionado en tubos Eppendorf estériles. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización para posteriores ensayos inmunológicos.

2.1.2. Muestras de leche

Las muestras de leche se obtuvieron luego de la desinfección del canal del pezón con alcohol, descartando los primeros chorros de leche. Se recogieron 8mL de leche por vaca (aproximadamente 2mL/cuarto) y se depositaron en tubos estériles para realizar la bacteriología post-desafío. Otros 40mL fueron colocados en tubos de plástico con conservante (Azidiol) y enviados refrigerados al Laboratorio Villa María (Villa María, Córdoba), para realizar el análisis de recuento de células somáticas (RCS). A los tubos con leche para bacteriología, luego de su siembra, se les agregó unas gotas de ácido acético, se centrifugaron y el suero se fraccionó en tubos Eppendorf estériles, los cuales se congelaron a -20°C hasta su utilización para posteriores ensayos inmunológicos.

2.2. Determinación de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas en suero de sangre y leche de vacas vacunadas y controles mediante el método de ELISA

2.2.1. Preparación del antígeno

Un cultivo bacteriano de 100mL crecido en TSB durante 18hs a 37°C con agitación, fue fraccionado en 10 tubos y centrifugado a 5000rpm durante 5min. Las células fueron resuspendidas en 5mL de buffer CO_3^- 0.05M pH 9.6 y sonicadas con un sonicador (Vibra-cell ultrasonic processors Model VC1000) durante 15min a una amplitud de 70Amp. Los tubos sonicados se centrifugaron a 5000rpm durante 5min; el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 10mL de buffer CO_3^- . Los tubos fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

2.2.2. Tratamiento de la policubeta

La policubeta fue tratada con 100µL de solución de glutaraldehído al 0,025% en buffer CO_3^- pH 9.6. Se incubó durante 1hs a 37°C y se realizaron tres lavados con solución de lavado.

2.2.3. Sensibilización de la policubeta

Todos los pocillos de las policubeta fueron sensibilizados con 100µL de la suspensión de células sonicadas. La policubeta fue incubada durante 2hs a 37°C y toda la noche en heladera a 4°C envuelta en nylon. Luego de la incubación, fue lavada tres veces con solución de lavado.

2.2.4. Bloqueo de la policubeta

Se colocaron en cada uno de los pocillos 100µL de solución de bloqueo y la placa se incubó durante 2hs a 37°C. Se lavó tres veces con solución de lavado.

2.2.5. Cuantificación de los anticuerpos

Luego del bloqueo, se agregó 100µL de una dilución 1:80 para el suero de sangre o de 1:10, para el suero de leche. Se incubó durante 2hs a 37°C y se lavó tres veces con solución de lavado. Para la determinación de IgG específica, se agregó 100µL de una dilución 1/10000 o 1/5000 de IgG monoclonal marcada con fosfatasa alcalina (anti-bovino, producida en ratón) para suero de sangre o de leche respectivamente. La placa se incubó durante 2hs a 37°C y se lavó tres veces con solución de lavado. Para la determinación de IgG₁, IgG₂, IgA e IgM, primero se agregó 100µL del anticuerpo monoclonal primario diluido 1/1000 (anti-bovino,

producido en ratón) y se incubó la placa durante 1hs a 37°C; luego se realizaron 3 lavados con solución de lavado; posteriormente se agregaron 100µL del anticuerpo monoclonal secundario marcado con fosfatasa alcalina (IgG anti- ratón, producida en conejo) en una dilución 1/2500 y se incubó 1hs más a 37°C. La placa fue lavada nuevamente tres veces con solución de lavado. Posteriormente, para ambas determinaciones, se agregó 100µL del reactivo de revelado y se incubó 30min a temperatura ambiente y en oscuridad. Para frenar la reacción enzimática, se colocó 100µL de solución stop.

La lectura se realizó a 405nm en un lector de ELISA (Labsystem Multiscan MS).

2.3. Determinación de la capacidad opsonica de sueros de vacas vacunadas y controles mediante ensayos de fagocitosis con PMN bovinos

2.3.1. Marcado bacteriano con isotiocianato de fluoresceína (FITC) isómero 1

Un cultivo crecido en 10mL de BHI durante 18-24hs con agitación, fue fraccionado y centrifugado durante 3min a 12000rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1mL de FITC/NaHCO₃ 0,1mg/mL e incubado a temperatura ambiente durante 1hs. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados con solución de Hanks para eliminar el FITC no adherido. Se conservó a 4°C hasta su utilización.

Para determinar la concentración de microorganismos, una alícuota del cultivo en BHI fue utilizada para titular y medir DO.

2.3.2. Aislamiento de neutrófilos PMN bovinos

Se extrajo 60mL de sangre de la vena yugular de bovinos sanos. La misma se colocó en un recipiente estéril conteniendo 6,6mL de ácido citrato-dextrosa 2X (anticoagulante) y se agitó suavemente para evitar la coagulación. La sangre obtenida fue fraccionada en dos botellas de vidrio, las cuales fueron centrifugadas durante 30min a 12000rpm a temperatura ambiente. Se descartó la capa superior e intermedia, correspondiente al plasma y buffy respectivamente. Los glóbulos rojos (capa inferior, junto a neutrófilos) fueron lisados agregando 60mL de solución de lisado fría, mezclando por inversión suavemente durante 60seg. Inmediatamente, se agregaron 30mL de solución de restauración fría (para restaurar la isotonicidad) y se

mezcló durante 20seg. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente las botellas durante 15min a 12000rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con pipeta Pasteur en 1mL de PBS. De ser necesario, se realizaron los pasos de lavado hasta obtener un pellet limpio (blanquecino). Por último, se resuspendieron los neutrófilos en 1mL de solución de Hanks y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización (no más de 2hs).

2.3.3. Determinación del número de neutrófilos (Recuento de neutrófilos totales)

Se mezclaron 50 μ l de la suspensión de neutrófilos con 1ml de la solución de Turk. Un volumen de 0.1mm³ fue cargado en la cámara de Neubauer y se contó el número de neutrófilos en cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara. Se determinó el *número de neutrófilos totales/mL* de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Neutrófilos totales} = \sum (\text{N}^{\circ} \text{ de neutrófilos en los 4 cuadrantes}) \times 20 \times 10^4$$

20 = dilución empleada (50 μ L de suspensión de neutrófilos en 1mL de Turk)

10⁴ = Volumen de la cámara de Neubauer.

2.3.4. Determinación de la viabilidad de neutrófilos

El porcentaje de viabilidad se determinó mediante el método de exclusión con azul tripán. Se realizó una dilución 1/10 de la suspensión celular y la solución colorante. Un volumen de 0.1mm³ fue cargado en la cámara de Neubauer y se contó el número de neutrófilos teñidos de azul (no viables) en cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara. Se determinó el *número de neutrófilos no viables/mL* de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Neutrófilos no viables} = \sum (\text{N}^{\circ} \text{ de neutrófilos no viables}) \times 10 \times 10^4$$

El *número de neutrófilos viables* se obtuvo por diferencia entre los neutrófilos totales y los neutrófilos no viables.

El porcentaje de células viables se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de cél. viables}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

2.3.5. Ensayo de fagocitosis

Las bacterias marcadas con FITC fueron opsonizadas por incubación con un pool de sueros diluidos (1/80 para sangre y 1/10 para leche) provenientes de vacas

vacunadas y no vacunadas durante 30min a 37°C con movimientos suaves. Los sueros de sangre de vacas del GV utilizados fueron los correspondientes a los tiempos (en días) -300 (Ts0, antes de la D1), -240 (Ts1, antes de la D2), -10 (Ts3, antes de la D3), 40 (Ts6, antes del Df) y como control, un pool de sueros de sangre de vacas del GNV del tiempo -300 (Ts0, antes de la D1). Los sueros de leche de vacas vacunadas utilizados fueron los correspondientes a los tiempos 20 (TI0, antes de la D4), 21, 40 (TI1 y TI2, antes del Df). Posteriormente, se adicionaron neutrófilos PMN en una relación neutrófilo:bacteria de 1:40 y se incubaron durante 30min a 30°C con movimientos suaves. La fagocitosis fue frenada por el agregado de 500µL de NaCl 0.85%-EDTA 0.04% refrigerado a 4°C. La fluorescencia extracelular fue neutralizada con el agregado de 100µL de azul de metileno al 1%.

La cuantificación de la fagocitosis se realizó al microscopio óptico con un aumento de 100X con aceite de inmersión, examinando por lo menos 200 células y contando el número de bacterias internalizadas en cada una. Se calculó el índice de fagocitosis (IF) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IF = (\% \text{ de neutrófilos conteniendo al menos 1 bacteria}) \times (\text{promedio del n}^\circ \text{ de bacterias/neutrófilos positivos}).$$

2.4. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos, se realizaron comparaciones entre tratamientos en cada tiempo utilizando un modelo mixto para análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas (Infostat y StatAdvisor). Un p-valor <0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados y Discusión

1. Esquema de vacunación

Los ensayos inmunológicos realizados en este trabajo de tesis forman parte de un ensayo de protección llevado a cabo previamente en el laboratorio de Genética Microbiana, en el cual se seleccionaron 9 vaquillonas Holando Argentino. Las mismas fueron divididas en dos grupos de 5 y 4 animales cada uno, constituyendo los grupos vacunado (GV) y no vacunado (GNV), respectivamente. Al GV se le inyectó por vía SC en la tabla del cuello, tres dosis de 3 ml cada una conteniendo aproximadamente 10^9 ufc de la cepa mutante RC122 liofilizada 30 días antes de la preñez, 30 días después de la preñez y 10 días antes del parto (figura 6), con el objeto de aumentar la producción de anticuerpos específicos en sangre de las vaquillonas al momento del parto (período de mayor susceptibilidad a la mastitis). Veinte días después del parto se administró una cuarta dosis por vía IM conteniendo 10^9 ufc de la cepa avirulenta inactivada con formol, con la cual se pretendió estimular el pasaje de anticuerpos específicos de la sangre a la leche para favorecer la fagocitosis. Veinte días después de la dosis IM, todos los animales (GV y GNV), fueron desafiados con 2×10^2 ufc/mL de la cepa parental virulenta RC108, con el fin de evaluar la capacidad protectora de la vacuna frente a la infección con *S. aureus*.

2. Determinación de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas en sangre de vacas vacunadas y controles mediante la técnica de ELISA

2.1. IgG específica

En la figura 7 se muestran los valores de DO obtenidos en la determinación de IgG específica frente a la cepa mutante avirulenta *S. aureus* RC122 en muestras de sangre de bovinos pertenecientes a los GV y GNV mediante la técnica de ELISA. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el título de IgG específica después de la administración de cada una de las tres dosis SC (D1, D2 y D3) en el GV. Este aumento permitió que los animales vacunados llegaran al parto (período de mayor susceptibilidad a infecciones) con un nivel de anticuerpos mayor al que tenían antes de comenzar con el ensayo ($p < 0.05$) y al que presentaron los animales del GNV en el mismo tiempo ($p < 0.05$). A los 10 días posteriores al parto, se observó una brusca disminución en el nivel de IgG específica debida, posiblemente, a la normal inmunosupresión que sufren las vacas a causa del stress posparto y a cambios fisiológicos originados por el mismo (Rainard y Poultrrel, 1982; Kherly y Goff, 1989). A los 20 días del parto, el título se elevó por la aplicación de la D4 por vía IM que

provocó una estimulación local, sumada a la respuesta sistémica obtenida previamente. A los 40 días postparto, todas las vacas fueron desafiadas con la cepa parental virulenta RC108, observándose en los tiempos posteriores un incremento significativo ($p < 0.05$) en el título de IgG específica que podría deberse al nuevo estímulo antigénico local, provocando la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Durante el ensayo, el nivel de IgG específica en cada uno de los tiempos, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el GV respecto al GNV, pudiéndose observar un efecto local y sistémico originado por la vacunación.

El aumento en los niveles de IgG específica en sangre coincide con resultados obtenidos por varios autores (Nordhaug y col., 1994; Leitner y col., 2000; O'Brien y col, 2000; O'Brien y col, 2001; Leitner y col., 2003a; Leitner y col., 2003b; Lee y col., 2005), variando la intensidad de la respuesta dependiendo del tipo de antígeno utilizado, de la dosis administrada, como así también de la ruta de inoculación y del esquema de vacunación empleado.

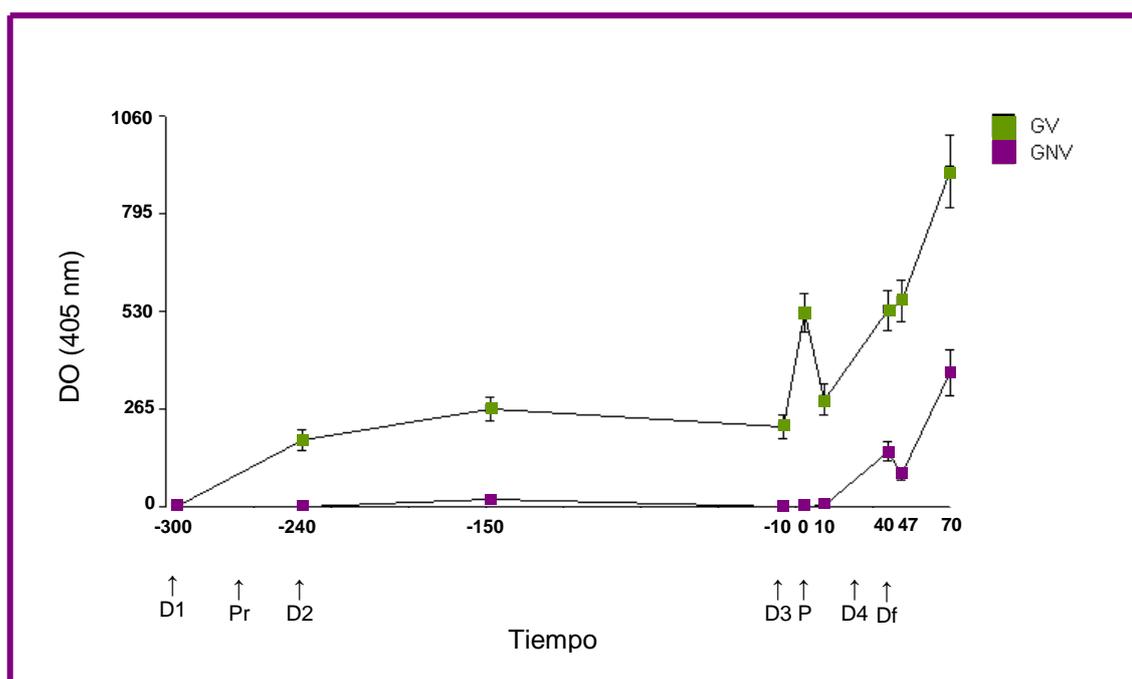


Figura 7: Niveles de IgG específica en muestras de sangre del GV y GNV determinados por ELISA. Las muestras de sangre fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados como la media \pm E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D1: dosis 1 SC. D2: dosis 2 SC. D3: dosis 3 SC. D4: dosis 4 IM. Pr: preñez. P: parto. Df: desafío

2.2. IgG₁ e IgG₂

La figura 8 muestra los niveles de anticuerpos de los subisotipos IgG₁ e IgG₂ para los tiempos analizados. En conjunto, el comportamiento fue similar al obtenido para la IgG específica tanto en el GV como en el GNV (figuras 7, 8 y 9). La administración de las tres dosis SC produjo un incremento en los niveles de IgG₁ e IgG₂ en vacas del GV. A los 10 días preparto (antes de la D3), se observó una disminución en los niveles de IgG₁ en GV que podría atribuirse a que, en este periodo, se está llevando a cabo la calostrogénesis, donde este subisotipo representa el 70-80% de las proteínas calostrales. La IgG₁ proveniente del torrente sanguíneo pasaría al calostro por un mecanismo de transporte específico que involucra receptores para el Fc de la IgG₁ presentes en las membranas celulares del acino mamario estimulado por la concentración de estrógeno y progesterona presentes en este periodo. Este hecho implicaría que, al momento del parto, los niveles de IgG específica en sangre estarían representados mayoritariamente por IgG₂, lo cual tiene gran importancia, ya que los neutrófilos de bovinos presentan receptores para este subisotipo y esto favorece a la defensa contra las infecciones bacterianas que ocurren en los días posteriores al parto. Al igual que para IgG específica, a los 10 días postparto, se observó una disminución en el título de ambos subisotipos debido a la normal inmunosupresión que atraviesan las vacas en este periodo. A los 20 días se administró a las vacas del GV la D4 IM. El efecto local producido por la misma se observó por una marcada inflamación en la ubre y una disminución en sangre de la IgG₂ (principal anticuerpo opsónico) con respecto a la IgG₁, debido a que ésta sería transportada por neutrófilos a la glándula mamaria por difusión pasiva. En los días posteriores a la D4 se observó un aumento de los niveles de IgG₁ tanto en el GV como en el GNV. Esto podría deberse a que, en procesos inflamatorios, se ha observado, además de la disminución de IgG₂ en suero, una supresión de la transferencia selectiva de IgG₁ de sangre a leche, con lo cual ésta última se incrementa en sangre (Lascelles, 1979). Después del desafío, se observó un incremento de los niveles de ambos subisotipos en suero.

Durante el ensayo, los niveles de ambos subisotipos en cada tiempo fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en el GV respecto al GNV.

Resultados similares fueron hallados por varios autores (Nordhaug y col., 1994; Leitner y col., 2000; O'Brien y col., 2000; O'Brien y col., 2001; Lee y col., 2005). De la misma forma que para IgG específica, la respuesta varía entre este y los demás ensayos, dependiendo del tipo de antígeno utilizado y dosis administrada, como así también de la ruta de inoculación y el esquema de vacunación empleado.

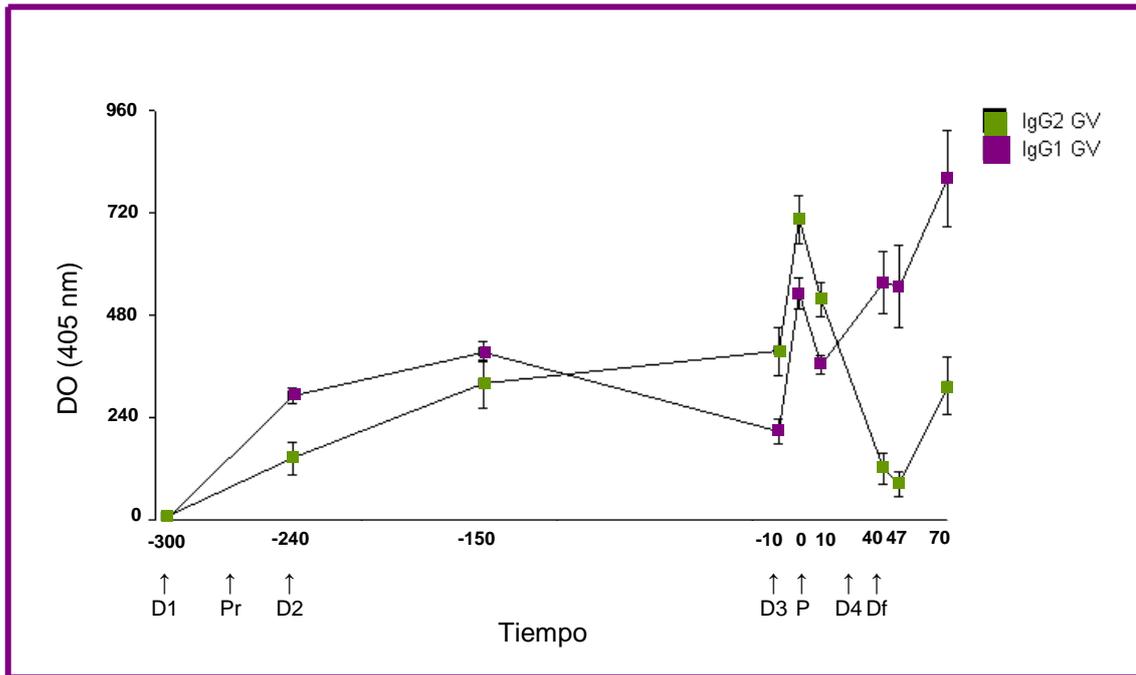


Figura 8: Niveles de IgG₁ e IgG₂ en muestras de sangre del GV determinados por ELISA. Las muestras de sangre fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados como la media \pm E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D1: dosis 1 SC. D2: dosis 2 SC. D3: dosis 3 SC. D4: dosis 4 IM. Pr: preñez. P: parto. Df: desafío

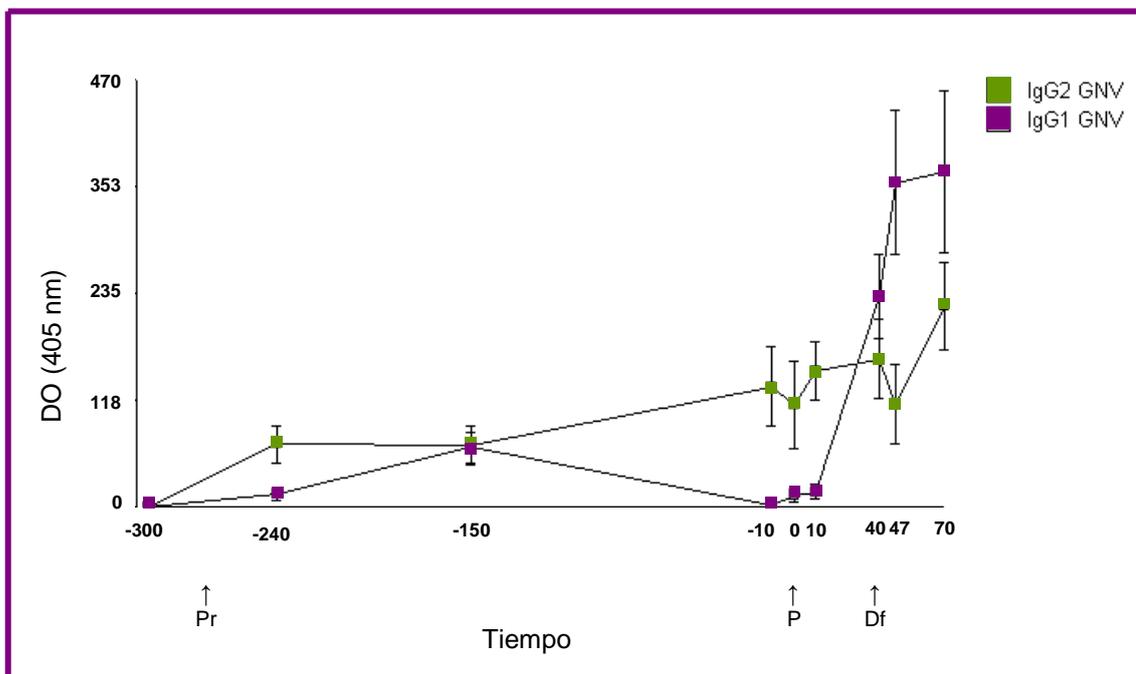


Figura 9: Niveles de IgG₁ e IgG₂ en muestras de sangre del GNV determinados por ELISA. Las muestras de sangre fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados como la media \pm E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D1: dosis 1 SC. D2: dosis 2 SC. D3: dosis 3 SC. D4: dosis 4 IM. Pr: preñez. P: parto. Df: desafío

2.3. IgM e IgA

Los resultados obtenidos a partir de la determinación de IgM se muestran en la figura 10. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los títulos obtenidos en muestras de sangre de ambos grupos. Esto puede deberse a que los anticuerpos de clase IgM son considerados “naturales”; es decir, son producidos en completa ausencia de estimulación antigénica externa. Ellos proveen una marcada e inmediata protección frente a los patógenos, antes que los anticuerpos adaptativos se desarrollen en el curso de la infección (Rainard y Riollot, 2006). Estos resultados son similares a los obtenidos por O'Brien y col, 2000; O'Brien y col, 2001; Lee y col., 2005.

En cuanto a la IgA, no se pudo detectar su presencia en muestras de sangre, posiblemente por encontrarse en bajas concentraciones. Esto coincide con los resultados obtenidos por Leitner y col., 2000. Además, se ha demostrado que la síntesis de este anticuerpo es principalmente local, motivo por el cual la mayoría de los autores determinan su presencia en muestras de leche y no en sangre.

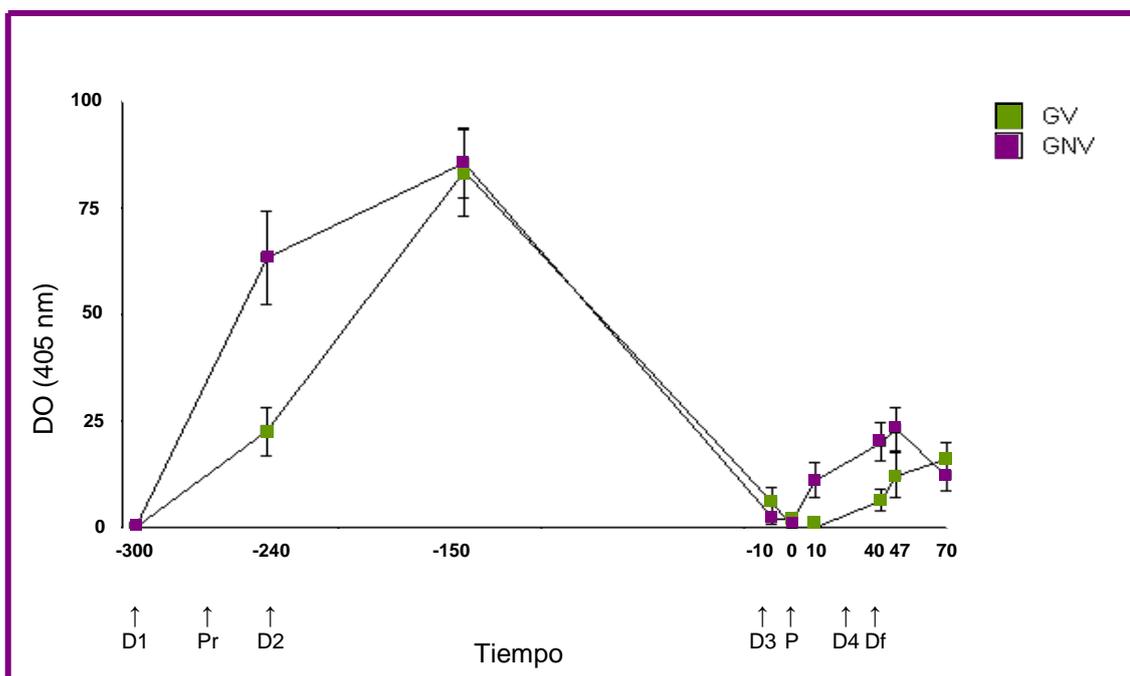


Figura 10: Niveles de IgM en muestras de sangre del GV y GNV determinados por ELISA. Las muestras de sangre fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados como la media + E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D1: dosis 1 SC. D2: dosis 2 SC. D3: dosis 3 SC. D4: dosis 4 IM. Pr: preñez. P: parto. Df: desafío

3. Determinación de diferentes isotipos y subisotipos de inmunoglobulinas en leche de vacas vacunadas y controles mediante la técnica de ELISA

3.1. IgG específica

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de IgG específica en leche entre GV y GNV antes de la administración de la D4. Es importante destacar que a diferencia de un ensayo de protección anterior (Pellegrino y col., 2008), donde se administraron 2 dosis de vacuna vía SC 30 y 10 días antes del parto, utilizando también, como cepa vacunal, a *S. aureus* RC122, y posteriormente se llevó a cabo el desafío IM con la cepa parental virulenta *S. aureus* RC108 a los 10 días postparto, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de IgG específica en leche entre animales del GV y GNV antes del desafío. El aumento observado podría deberse al pasaje de IgG específica de sangre a leche en los tiempos postparto; además, aquellos animales inmunizados previamente con 3 dosis de vacuna SC, presentaron títulos mayores de anticuerpos en sangre que aquellos que no fueron vacunados. Con la aplicación de la D4 y posterior desafío IM, se logró estimular el pasaje de anticuerpos séricos a leche, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los niveles alcanzados en leche luego de ambos estímulos locales en el GV. Esto significa que la D4 no tuvo el efecto deseado, ya que sin ella, las vacas expuestas a las 3 dosis SC previas, igual presentan un título elevado de IgG específica en leche a los 20 días postparto respecto del GNV y con respecto al título al momento del desafío. En ambos grupos, a los 7 y 14 días postdesafío, se observó un brusco descenso en el nivel de IgG específica. Esto podría deberse a la reacción que se produce entre los anticuerpos y el patógeno, ya que al ser alguno de ellos opsónicos, se unen al mismo, impidiendo su detección. A los 14 y 21 días postdesafío, se observó un incremento significativo en el nivel de IgG específica en leche en vacas vacunadas con respecto a las controles.

Estos resultados no concuerdan con los hallados por Leitner y col. en el 2000, ya que a pesar de que coincide el hecho de que los niveles de IgG específica en leche fueron menores que los hallados en sangre, no se encontraron diferencias en los títulos de este anticuerpo entre una glándula infectada y una sana.

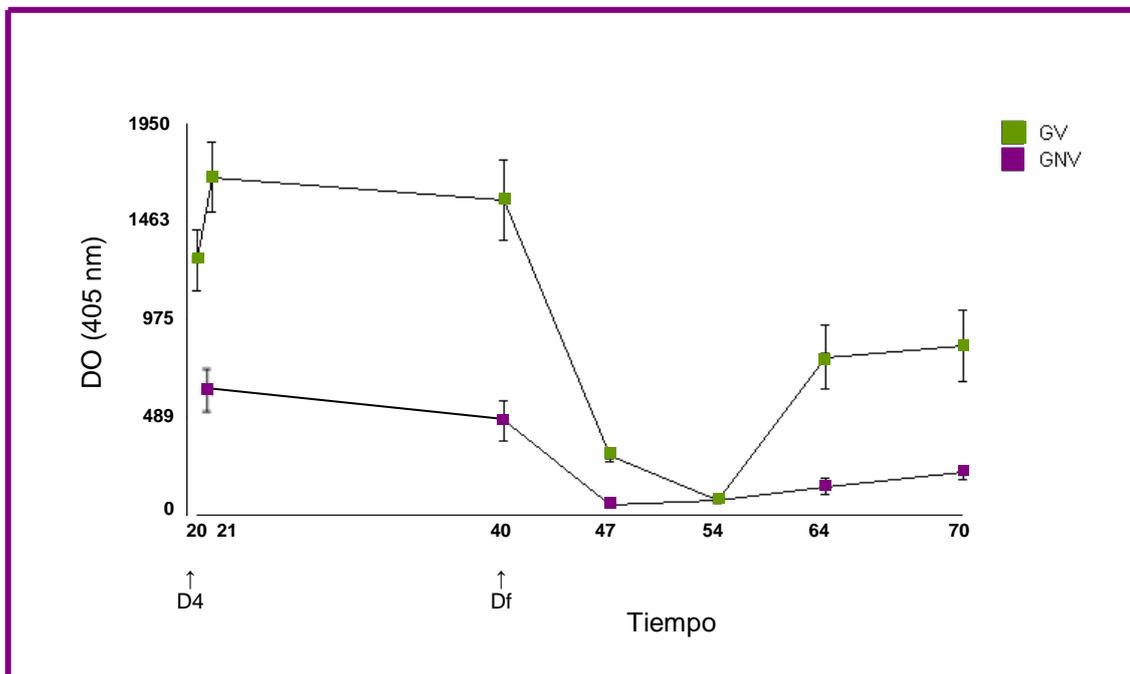


Figura 11: Niveles de IgG específica en muestras de leche del GV y GNV determinados por ELISA. Las muestras de leche fueron diluidas 1/10. Los datos son expresados como la media + E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D4: dosis 4 IM. Df: desafío

3.2. IgG₁ e IgG₂

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de ambos subisotipos de inmunoglobulinas en muestras de leche pertenecientes a vacas del GV. Luego de la administración de la D4, se observó un aumento en la concentración de IgG₂ en leche; esto se debe, posiblemente, a la síntesis local y/o transporte de este isotipo desde la corriente sanguínea a la secreción láctea (resultados observados en la figura 8). Además, el efecto inflamatorio originado por la D4 podría haber provocado la supresión de la transferencia selectiva de IgG₁ de sangre a leche, con lo cual no se evidenció un incremento en la concentración de este subisotipo en leche. A los 40 días postparto, los animales fueron desafiados con la cepa parental virulenta, lo cual se tradujo en una disminución en los títulos de anticuerpos opsonicos detectados, que posiblemente se unieron al patógeno y la técnica sólo permite detectar inmunoglobulinas libres. A diferencia de lo observado en la determinación de la IgG específica y subisotipos en sangre, el comportamiento de ambos subisotipos de IgG en leche en el GV no se relaciona con el hallado para IgG específica en leche (figura 11 y 12). Esto puede deberse a la concentración

extremadamente baja de cada uno de los subisotipos en la leche. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Nordhaug y col., 1994 y Leitner y col., 2000, quienes tampoco pudieron establecer una relación lineal entre las concentraciones entre IgG específica y ambos subisotipos en muestras de leche de cuartos de vacas vacunadas o controles (a diferencia de lo obtenido para sangre).

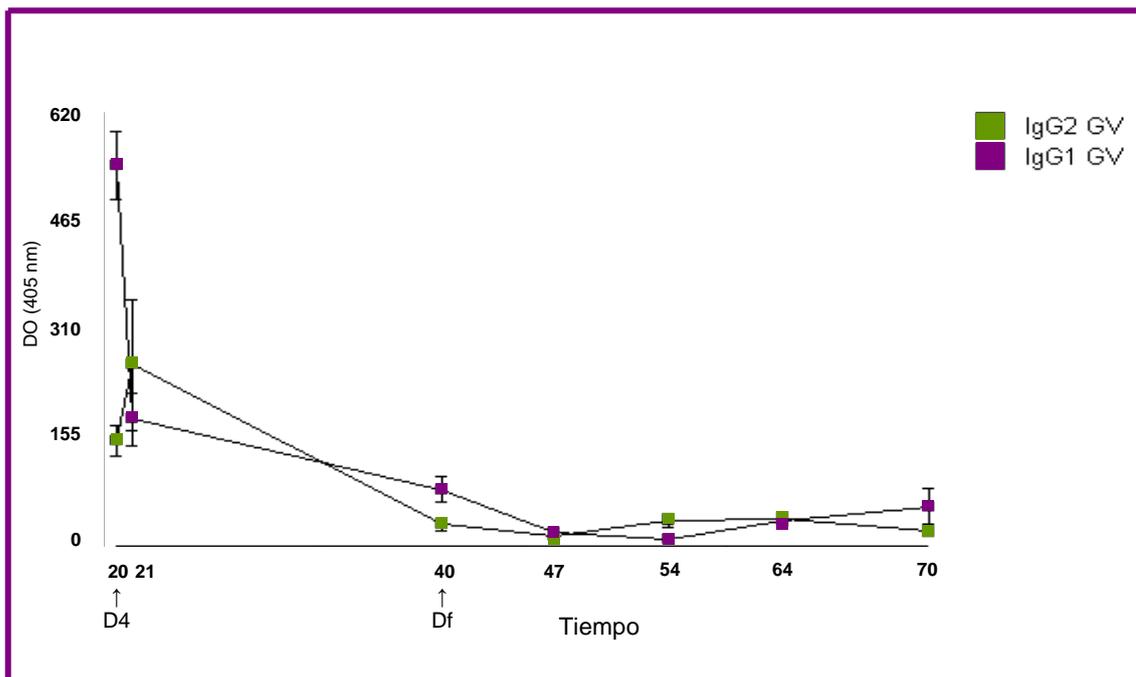


Figura 12: Niveles de IgG₁ e IgG₂ en muestras de leche del GV determinados por ELISA. Las muestras de leche fueron diluidas 1/10. Los datos son expresados como la media + E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D4: dosis 4 IM. Df: desafío

3.3. IgM e IgA

El origen de la IgM en secreciones lácteas es principalmente sanguíneo, aunque una baja proporción es sintetizada localmente en el epitelio glandular mamario. Aún así, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en los títulos de IgM hallados en muestras de leche tanto del GV como del GNV (figura 13). Estos resultados coinciden con los hallados en sangre.

Al igual que en sangre, la IgA no pudo ser detectada. Aunque este isotipo es más abundante en leche que en suero, debido a que su producción es exclusivamente local, la IgA se asocia a las caseínas en forma de micelas, lo que dificulta su determinación. Estos resultados no coinciden con los hallados por Leitner y col., 2000, quienes detectaron IgA específica en leche, aunque en muy baja concentración y no en todos los cuartos estudiados.

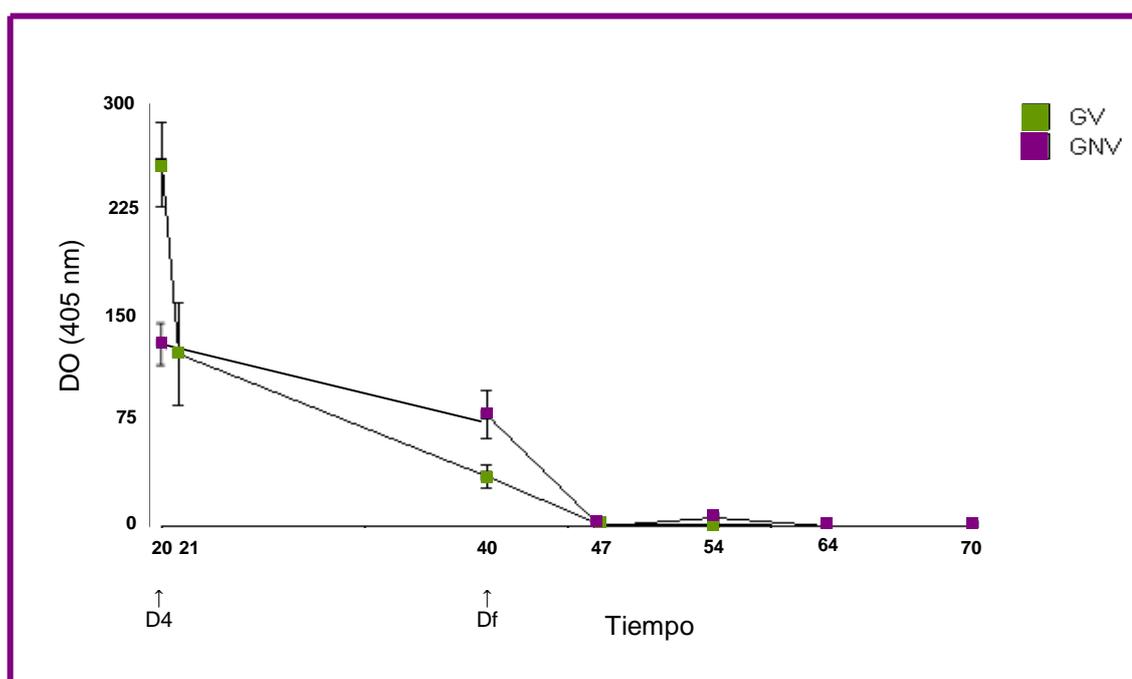


Figura 13: Niveles de IgM en muestras de leche del GV y GNV determinados por ELISA. Las muestras de leche fueron diluidas 1/10. Los datos son expresados como la media + E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. D4: dosis 4 IM. Df: desafío

4. Determinación de reactividad cruzada de anticuerpos anti-RC122 frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*

Se realizó este ensayo para poder determinar si los anticuerpos presentes en un pool de sueros de vacas inmunizadas son capaces de reaccionar con diferentes cepas a la utilizada como vacuna. Como antígeno, se utilizaron 6 cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis clínica (3) y de humanos sanos (3). En la tabla 4 se observan los valores medios de DO determinados mediante la técnica de ELISA para cada uno de los antígenos ensayados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los valores de DO de las cepas ensayadas y la cepa vacunal, por lo que se podría decir que los anticuerpos (IgG específica) producidos contra la cepa RC122, reconocerían epitopes en cepas de *S. aureus* heterólogas aisladas de bovinos y humanos.

Tabla 4: DO promedio correspondiente a la determinación de IgG específica por ELISA utilizando como antígeno cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes frente a un pool de sueros de vacas inmunizadas con la mutante RC122.

Cepa	n	DO promedio	D.E.	E.E.
RC122	5	1953.60	393.37	175.90
B1	5	2644.40	147.71	66.06
B2	5	1921.40	161.37	72.17
B3	5	2547.20	103.98	46.50
H1	5	2141.80	258.50	115.60
H2	5	2817.40	23.43	10.48
H3	5	3177.00	80.04	35.79

B1-B3: cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis clínica.
H1-H3: cepas de *S. aureus* aisladas de humanos sanos.

5. Determinación de la capacidad opsonica de sueros de vacas vacunadas y controles mediante ensayos de fagocitosis con PMN bovinos

La IgG₂ e IgM son las principales opsoninas conocidas que estimulan la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos. Estos anticuerpos ejercen su acción uniéndose directamente al patógeno o a componentes del Complemento (C3b). Neutrófilos y macrófagos pueden unir complejos anticuerpo-bacteria o complejos anticuerpo-C3b-bacteria vía sus receptores para el Fc y hacer más efectivos los procesos de fagocitosis (Sordillo y DeRosa, 1997). El objeto de estimular la síntesis de anticuerpos opsonicos es favorecer a estos procesos, principalmente aquellos mediados por neutrófilos PMN bovinos ya que, la eliminación de patógenos y la protección efectiva lograda con la vacunación, depende, básicamente, de ello. Una vez detectados los anticuerpos en suero de sangre y leche, se prosiguió con la evaluación de la capacidad de estos anticuerpos de opsonizar diferentes cepas bacterianas, incluida la cepa vacunal utilizada en este ensayo de protección.

5.1. Fagocitosis de *Staphylococcus aureus* RC122 por PMN bovinos

Se utilizaron pool de sueros de sangre obtenidos antes de cada dosis de vacuna y antes del Df, según se detalló en materiales y métodos. Como se observa en la figura 14, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el IF obtenido antes del desafío y el detectado en los tiempos anteriores al mismo, como así también al detectado en sueros de vacas del GNV. Estos resultados concuerdan con los niveles de IgG₂ obtenidos en sangre antes de la D2 y la D3. Esto es importante ya que, como se describió anteriormente, los neutrófilos poseen receptores para el Fc de este subisotipo, con lo cual se ven favorecidos los procesos de fagocitosis. Aún así, el mayor IF se obtuvo antes del desafío, lo cual no concuerda con los niveles de IgG₂ observados en sangre (son menores que los encontrados en tiempos anteriores). Resultados similares fueron descritos por O'Brien y col., 2000, quienes no pudieron relacionar los altos niveles de fagocitosis a la semana 20 post-vacunación con los bajos títulos de IgG₂ obtenidos en ese mismo tiempo. Ellos sugieren que un mínimo aumento en los niveles de este subisotipo sería necesario para favorecer la fagocitosis.

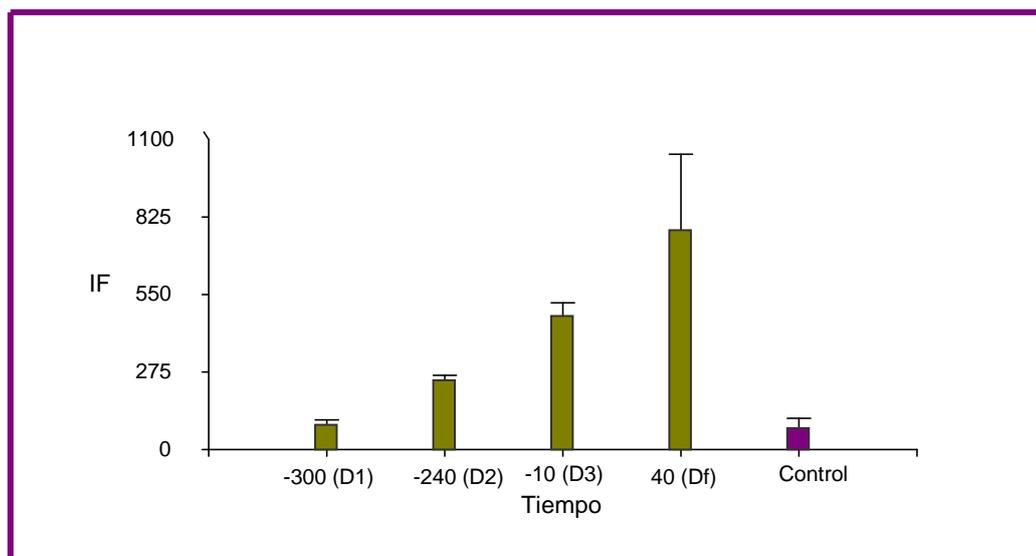


Figura 14: Índice de fagocitosis (IF) contra la cepa mutante avirulenta *S. aureus* RC122 opsonizada con sueros de sangre de vacas del GV (antes de la D1, D2, D3 y Df) y GNV (control).

5.2. Fagocitosis con PMN bovinos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes

Este ensayo se realizó para poder determinar si los anticuerpos presentes en vacas del GV eran capaces de opsonizar no sólo a la cepa vacunal, sino también a cepas heterólogas. En función de los resultados obtenidos en el ensayo de fagocitosis anterior (5.1), se utilizó un pool de sueros obtenidos antes del desafío (donde se encontró mayor IF) para opsonizar a la cepa RC122, a la cepa parental virulenta (*S. aureus* RC108), a una cepa hipercapsulada de origen humano (*S. aureus* Smith) y a otras dos cepas de origen bovino aisladas de mastitis clínica (547-1 y 95-1). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15. Se observó que todas las cepas fueron fagocitadas. Esto indicaría que los anticuerpos producidos contra la cepa vacunal serían capaces de opsonizar a cepas de *S. aureus* heterólogas aisladas de bovinos y humanos (figura 16). Se puede observar una similitud entre el IF obtenido con la cepa vacunal RC122 y con la cepa Smith; incluso éstos resultaron ser mayores que el IF obtenido con la cepa parental RC108. Esto coincide con los resultados obtenidos por Bogni y col. en 1998, quienes llevaron a cabo un ensayo de protección en ratones, utilizando como cepa vacunal a la mutante avirulenta RC122. Los animales inmunizados y controles fueron desafiados con las cepas RC108 (parental virulenta) y Smith (heteróloga), entre otras. Se observó que la mutante otorgó mayor protección (medida por DL_{50}) frente a la Smith (ratio 90) que frente a la RC108 (ratio 40). Esto,

sumado a los resultados obtenidos en el ensayo de fagocitosis, indicaría que la mutante RC122 es capaz de producir cápsula in vivo.

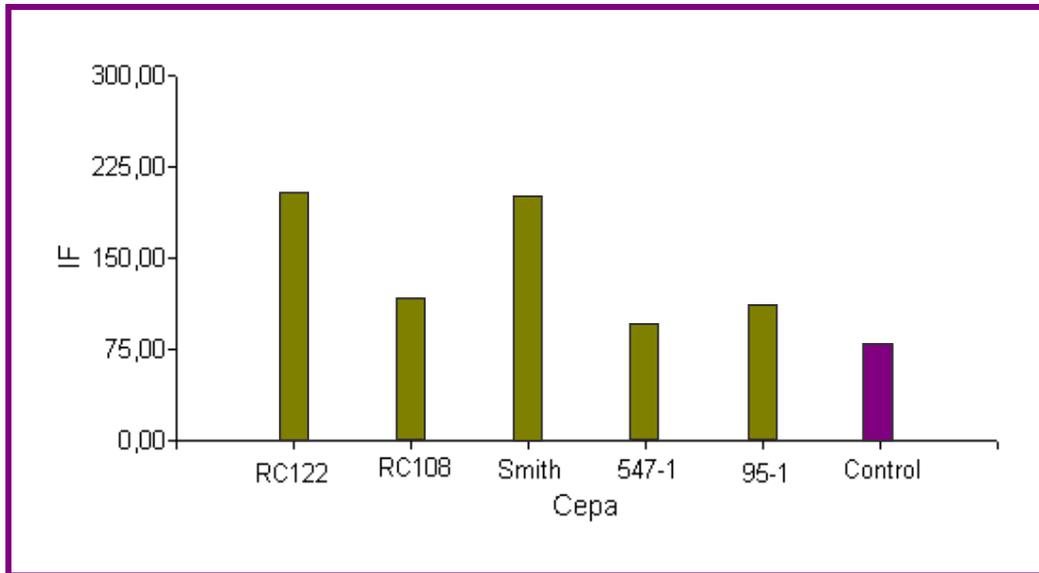


Figura 15: Índice de fagocitosis (IF) contra diferentes cepas de *S. aureus*: RC122: cepa vacunal; RC108: cepa parental virulenta; Smith: cepa hipercapsulada de origen humano; 547-1 y 95-1: cepas de origen bovino causantes de mastitis clínica. Todas fueron opsonizadas con pool de sueros de vacas del GV correspondientes a antes del Df.

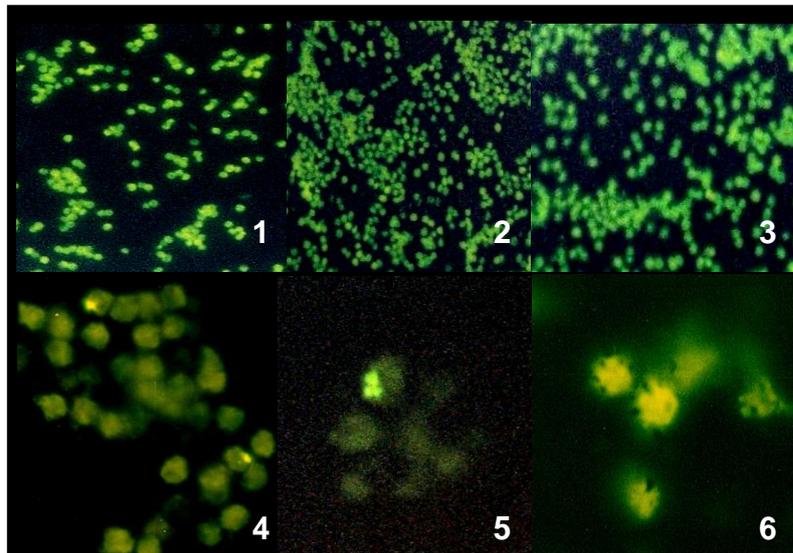


Figura 16: Microfotografías de fluorescencia de cepas de *S. aureus* marcadas con FITC. 1: *S. aureus* RC122. 2: *S. aureus* RC108. 3: *S. aureus* Smith. 4: *S. aureus* RC122 fagocitada por neutrófilos bovinos. 5: *S. aureus* RC108 fagocitada por neutrófilos bovinos. 6: *S. aureus* Smith fagocitada por neutrófilos bovinos.

5.3. Determinación de la capacidad opsónica de sueros de leche de vacas vacunadas y controles mediante ensayos de fagocitosis con PMN bovinos frente a *Staphylococcus aureus* RC122

Al igual que en sangre, se determinó la capacidad opsónica de anticuerpos de leche frente a la cepa vacunal en diferentes tiempos, según se detalló en materiales y métodos. Como se muestra en la figura 17, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los IF hallados a distintos tiempos dentro del GV y con respecto al control. Se observa un aumento mínimo en el IF a las 24hs de aplicada la D4. Esto se debe al pasaje de anticuerpos opsónicos de sangre a leche (IgG_2 fundamentalmente) logrado frente al estímulo local provocado por la dosis de vacuna IM.

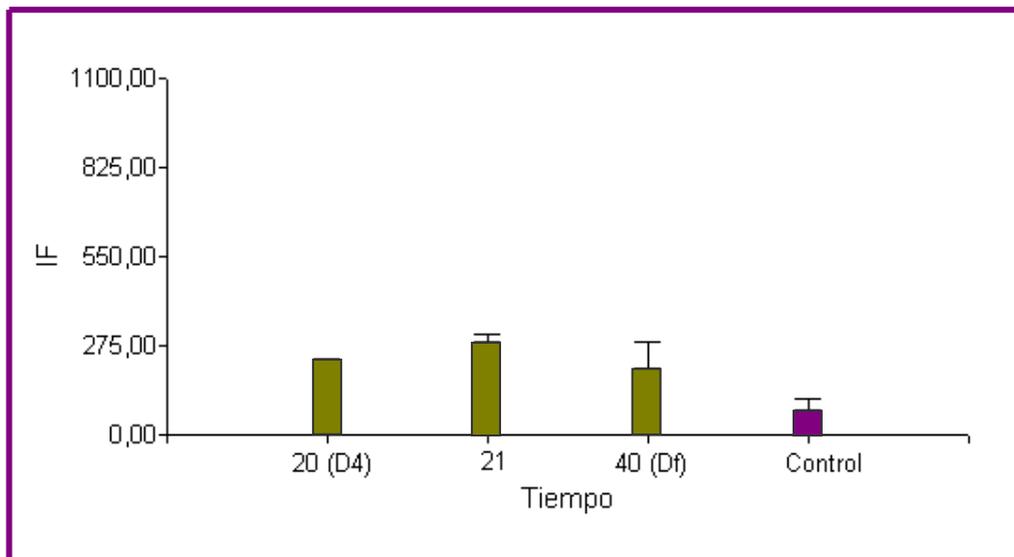


Figura 17: Índice de fagocitosis (IF) contra la cepa mutante avirulenta *S. aureus* RC122 opsonizada con sueros de leche de vacas del GV (antes de la D4, 24hs después y antes del Df) y GNV (control).

Conclusión

Durante el ensayo de protección realizado, se pudo observar que las vaquillonas sometidas a la aplicación de tres dosis SC y una cuarta dosis IM, presentaron mayores niveles de anticuerpos opsónicos que aquellos animales no inmunizados. Esto quedó demostrado cuando todos los animales (GV y GNV) fueron desafiados con la cepa parental virulenta. Las vacas vacunadas llegaron al parto con un mayor título de anticuerpos en sangre generados por el estímulo sistémico. Además, antes de la aplicación de la D4, los animales vacunados presentaron títulos significativamente mayores de anticuerpos en leche, con lo cual la administración de esta última dosis de vacuna no tendría un efecto considerable. Por otro lado, cuando las vacas de ambos grupos fueron desafiadas, se pudo observar que las vacunadas presentaron un menor porcentaje de infección. También se observó un IF por neutrófilos PMN significativamente mayor en sueros de sangre y leche del GV, no sólo en los ensayos realizados con la cepa vacunal, sino también para la cepa parental y cepas heterólogas de origen bovino y humano.

Podemos concluir que el esquema de vacunación utilizado, empleando la mutante avirulenta *S. aureus* RC122 como inmunógeno, genera una respuesta inmunológica elevada en sangre y leche de vaquillonas vacunadas, dada por un aumento de los niveles de anticuerpos opsónicos, lo cual favorece la fagocitosis por parte de neutrófilos PMN bovinos, principal barrera de defensa contra patógenos intramamarios bovinos.

Bibliografía

- ✓ Almeida, R. A.; Matthews, K. R.; Cifrian, E.; Guidry, A. J.; Oliver, S. P. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J. Dairy Sci. 79:1021–1026.
- ✓ Anderson, K.L.; Smith, A.R.; Shanks, R.D.; Whitmore, H.L. , Davis, L.E.; Gustafsson.; B.K.. 1986. Endotoxin-induced bovine mastitis: immunoglobulins, phagocytosis, and effect of flunixinmeglumine. Am. J. Vet. Res. 47:2405.
- ✓ Anónimo. Mastitis. La enfermedad y su transmisión. 2005. Disponible en: <http://www.infocarne.com>.
- ✓ Anónimo. Mastitis. Prevención y detección. 2005. Disponible en: <http://www.infocarne.com>.
- ✓ ALMAST (Asociación Argentina de lucha contra la mastitis). 1998. Estimación de las pérdidas en volumen provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina. Comité Federal de Lechería, Ant. VI Lech. p. 73.
- ✓ Baumann, H.; J. Graudie. 1994. The acute phase response. Immunol. Today 15:74.
- ✓ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2008. Disponible en: <http://www.bergeys.org/>.
- ✓ Bogni, C.; Segura, M.; Giraudo, J.; Giraudo, A.; Calzolari, A. Nagel, R. 1998. Avirulence and Immunogenicity in mice of a Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Mutant. J. Vet. Res. 62:293-298.
- ✓ Bogni, C.; Segura, M.; Rampone, A.; Giraudo, J.; Gonzáles Quintana, H.; Calzolari, A.; Nagel, R. 1993. Avirulencia en el ratón de mutantes de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina. Noviembre. Congreso internacional de veterinaria, La Plata.
- ✓ Booth, J. M. 1995. Progress in the control of mastitis. Page S-4, In: Proc. 3rd IDF Int. Mastitis Seminar, Tel-Aviv, Israel.
- ✓ Butler, J.E. 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet. Immunol. Immunopathol. 4:43.
- ✓ Butler, J.E. 1998. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. Rev. Sci. Tech. 17:43.
- ✓ Caffin, J.P.; Poutrel, B. 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G₂ concentration in milk. J. Dairy Sci. 71:2035.

- ✓ Cai, T.Q.; Weston, P.G.; Lund, L.A.; Brodie, B.; McKenna, D.J.; Wagner, W.C.; 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.*55:934.
- ✓ Calvino, L. F.; Delgado, A. R.; Vitulich, C. A. Occhi, H. L. ; Canavesio, V. R.; Zubriggen, M. A.; Tarabla, H. D. 1991. Susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas en tambos de la cuenca lechera santafesina. *Vet. Arg.* 8:677.
- ✓ Calvino, L. 2007. Control de mastitis causadas por estreptococos ambientales. Jornada APROCAL – INTA Rafaela, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- ✓ Carrión, G. M. 2002. Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de la leche. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional de Michoacán. pp. 6-20, 55.
- ✓ Carter, E .W.; Kerr, D. E. 2003. Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against *Staphylococcal mastitis*. *J. Dairy Sci.* 86:1177.
- ✓ Cháves, J. 1996. Cómo debe actuar un productor que produce leche con más de 500 000 células somáticas y/o elevados recuentos bacterianos. *Memorias del Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis*. Río Cuarto. p. 67.
- ✓ Corbellini, C. N. 1996. Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. UNRC.
- ✓ Craven, N. 1985. Do rising fat-globules assist microbial invasion via the teat duct between milking? *Kieler Milch. Forschung.* 37:554.
- ✓ DeRosa, D. C.; Sordillo, L. M. 1997. Efficacy of a bovine *Staphylococcus aureus* vaccine using interleukin-2 as an adjuvant. *Zentralbl Veterinarmed B.* 44(10):599-607.
- ✓ Dettleux, J.C.; Kehrl, M.E. , Stabel, J.R.; Freeman, A.E.; Kelley, D.H.. 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44:251.
- ✓ Dohoo, I. R.; Leslie, K. E. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 10:225-237.
- ✓ Dziewanowska, K.; Patti, J. M.; Deobaid, C. F.; Bayles, K. W.; Trumble, W. R.; Bohach, G. A. 1999. Fibronectin Binding Protein and Host Cell Tyrosine Kinase are

- required for Internalization of *Staphylococcus aureus* by Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 67:4673.
- ✓ García, A. 2007. Mastitis Contagiosa vs. Ambiental. South Dakota State University.
 - ✓ Giraudó, J. A.; Busso, J. J. 1981. Mastitis: un Estudio de Situación en Tambos de Adelia María, Provincia de Córdoba. UNRC. *Rev. UNRC* 1(1):41.
 - ✓ Giraudó, J.A. 1996. Conceptos básicos sobre inmunología de la Glándula Mamaria y utilización de vacunas contra Mastitis. Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. UNRC. p.p: 80.
 - ✓ Giraudó, J. A.; Calzolari, A.; Rampone, H.; Giraudó, A. T.; Bogni, C.; Larriestra, A.; Nagel, R. 1997. Field trials of a vaccine against Bovine Mastitis. I. Evaluation in Heifers. *J. Dairy Sci.* 80:845.
 - ✓ Glauber, C. E.; 2005. Análisis de riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP) en la Producción primaria de Leche bovina. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. *Suplemento Técnico Veterinario. Revista del Colegio. Producción lechera*, p. 30.
 - ✓ Gomez, M. I.; Sordelli, D. O.; Buzzola, F. R.; García, V. E. 2002. Induction of Cell-Mediated Immunity to *Staphylococcus aureus* in the Mouse Mammary Gland by Local Immunization with a Live Attenuated Mutant. *Infect. Immun.* 70(8):4254.
 - ✓ González, R. N.; Giraudó, J. A.; Busso, J. J. 1980. Investigación en mastitis subclínicas. II. Agentes etiológicos bacterianos. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)*. 61:225.
 - ✓ González, R. N. 1993. Evaluación de Técnicas y procedimientos utilizados en el diagnóstico, prevención y control de la Mastitis Bovina. College of Veterinary Medicine, Cornell University, New York.
 - ✓ González, R. N. 1996. El Programa de Control de Mastitis del estado de Nueva York. Estados Unidos de América. *Memorias del Congreso Nacional de Calidad de Leche y Mastitis. Río Cuarto*. p.p.: 9.
 - ✓ Guidry, A. J.; Paape, M. J.; Pearson, R. E. 1976. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids and neutrophil phagocytosis in the cow. *Am. J. Vet. Res.* 37:1195.
 - ✓ Guidry, A.J.; R.E. Pearson, M.J. Paape, and W.F. Williams. 1980a. Relationship among leukocyte phagocytosis, milk immunoglobulins, and susceptibility to intramammary infection. *Am. J. Vet. Res.* 41:997.

- ✓ Guidry, A.J.; Paape, M.J.; Pearson, R.E. 1980b. Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 41:751.
- ✓ Guidry, A.J.; Ost, M.; Mather, I.H.; Shainline, W.E.; Weinland, B.T.. 1983. Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxin into the mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 44:2262.
- ✓ Guidry, A. J.; Berning, L. M.; Hambleton, C. N. 1993. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by Bovine Immunoglobulin Isotypes. *J. Dairy Sci.* 76:1285.
- ✓ Halasa, T.; Huijps, K.; Osteras, O.; Hogeveen, H. 2007. Economics effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly.* 29 (1): 18.
- ✓ Hensen, S. M.; Pavicic, M. J.; Lohuis, J. A.; Poutrel, B. 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.* 83:418.
- ✓ Hibbitt, K. G, Cole, C. B, Reiter, B. 1969. Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *J. Gen. Microbiol.* 56:365.
- ✓ Hill, A.W.; Heneghan, D.J. , Field, T.R.; Williams, M.R. 1983a. Increase in specific opsonic activity in bovine milk following experimental *Escherichia coli* mastitis. *Res. Vet. Sci.* 35:222.
- ✓ Hill, A.W.; Heneghan, D.J. , Field, T.R.; Williams, M.R. 1983b. The opsonic activity of bovine milk whey for the phagocytosis and killing by neutrophils of encapsulated and non-encapsulated *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 8:293.
- ✓ Howard, C.J.; Taylor, G.; Brownlie, J.. 1980. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages.. *Res. Vet. Sci.* 29:128.
- ✓ Hwang, C. Y.; Pak, S. I.; Han, H. R. 2000. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 62(8):875.
- ✓ Jain, N.C.; J. Lasmanis. 1978. Phagocytosis of serum-resistant and serum-sensitive coliform bacteria (*Klebsiella*) by bovine neutrophils from blood and mastitis milk. *Am. J. Vet. Res.* 39:425.
- ✓ Kirk, John H.. 1998. Principios y bases para la prevención de mastitis. University of California-Davis, Veterinary Medical Teaching and Research Center, Tulare, CA, USA.

- ✓ Kherli, M.E.; Goff, J. P. 1989. Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte functions. *J. Dairy Sci.*; No. 72, pp. 1188.
- ✓ Kehrli, M.E.; B.J. Nonnecke, Roth, J.A. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50:207.
- ✓ Kehrli, M.E.; Harp, J.A. 2001. Immunity in the mammary gland. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 17:495.
- ✓ Kennedy, J. W.; Watson, D. L.; Bennell, M. A. 1981. The early phase of the immune response to live and killed *Staphylococcus aureus* vaccines in sheep-cellular and immunoglobulin parameters. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2:367.
- ✓ Kenneth Todar. 2005. *Staphylococcus*. University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.
- ✓ Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. 1999. "Diagnóstico Microbiológico" 5° ed. Editorial médica Panamericana. Cap. 11, p. 529.
- ✓ Lascelles, A.K. 1979. The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J. Dairy Sci.* 62:154.
- ✓ Leavens, H.; Deluyker, H.; Schukken, Y. H.; De Meulemeester, L.; Vandermeersch, R.; De Muelenaere, E.; De Kruif, A. 1997. Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3219-3226.
- ✓ Lee, J. C. 1998. An experimental vaccine that targets Staphylococcal virulence. *Trends Microbiol.* 6(12):461.
- ✓ Lee, J.; O'Brien, C. N.; Guidry, A. J.; Paape, M. J.; Shafer-Weaver, A.; Zhao, X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can. J. Vet. Res.* 69:11.
- ✓ Leitner, G.; Yadlin, A.; Glickman, A.; Chaffer, M. and Saran, A. 2000. Systemic and local immune response of cows to intramammary infection with *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Science.* 69, 181-184.
- ✓ Leitner, G.; Lubashevsky, E.; Glickman, A.; Winkler, M.; Saran, A.; Trainin, Z. 2003a. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93:31.

- ✓ Leitner, G.; Yadlin, N.; Lubashevsky, E.; Ezra, E.; Glickman, A.; Chaffer, M.; Winkler, M.; Saran, A.; Trainin, Z. 2003b. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. Vet. Immunol. Immunopathol. 93:153.
- ✓ Leslie, K. E.; Schukken, Y. H.; Sargeant, J.; Mitchell, M. 1997. Inhibitor violations during 10 years in Ontario. Association with Somatic Cell Count reduction program. Report to the Ontario Bureau of Veterinary drugs.
- ✓ Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339, pp.:520.
- ✓ Mackie, D.P.; E.F. Logan. 1986. Changes in immunoglobulin levels in whey during experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis. Res. Vet. Sci. 40:183.
- ✓ Madigan, M. T.; Martinko, J. M. y Parker, J. 1999. Brock Biología de los Microorganismos. 8° Ed. Editorial Prentice Hall. Cap. 10, p.p.: 384.
- ✓ Martí Cruz Alamilla, M. 2007. La mastitis bovina y su impacto en la calidad de la leche. Ponencia presentada en el Quinto Encuentro Ganadero de VIPRESA Tepatitlán, Jalisco, 20 de Abril 2007. Publicada con autorización de VIPRESA.
- ✓ Mastitis, 2005. Mastitis: Enfermedad y transmisión. Disponible en: <http://www.agrobit.com>.
- ✓ Miller, R.H.; Guidry, A.J.; Paape, M.J.; Dulin, A.M., Fulton; L.A. 1988. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. Am. J. Res. Res. 49:42.
- ✓ Nagahata, H.; Makino, S.; Takeda, S.; Takahashi, H.; Noda; H. 1988. Assessment of neutrophil function in the dairy cow during the perinatal period. J. Vet. Med. 35:747.
- ✓ National Mastitis Council. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI. National Mastitis Council. p.p.: 222.
- ✓ National Mastitis Council. 2003. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4thed. National Mastitis Council, W. D. Hoard and Sons Co.; Fort Atkinson, WI.
- ✓ National Mastitis Council. 2008. Disponible en: <http://www.nmconline.org>.
- ✓ Nelson, L.; Flock, J. 1992. Adhesins in *Staphylococcus* as vaccine components. Flem. Vet. J. 62(1):111.
- ✓ Nickerson, S. C.; Heald, C. W. 1981. Hystopathology Response of the Bovine Mammary Gland to Experimental Induced *Staphylococcus aureus* Infection. Am. J. of Vet. Res. 42(8):1351.

- ✓ Nickerson, S. C. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187(1):41.
- ✓ Nickerson, S. C. 1993. Vaccination programs for preventing and controlling mastitis. National Mastitis council regional meeting proceeding. p.p.: 64.
- ✓ Nordhaug, M. L.; Nesse, L. L.; Norcross, N. L.; Gudding, R. 1994. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody Response. *J. Dairy Sci.* 77:1276-1284.
- ✓ O'Brien, C. N.; Guidry, A. J.; Fattom, A.; Shepherd, S.; Douglass, L. W. ; Westhoff, D. C. 2000. Production of Antibodies to *Staphylococcus aureus* Serotypes 5, 8 and 336 Using Poly (DL- Lactide-co-Glycolide) Microspheres. *J. Dairy Sci.* 83:1758.
- ✓ O'Brien, C. N.; Guidry, A. J.; Douglass, L. W. ; Westhoff, D. C. 2001. Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. *J. Dairy Sci.* 84(8):1791.
- ✓ O'Flaherty, S.; Ross, R. P.; Flynn, J.; Meaney, W. J.; Fitzgerald, G. F.; Coffey, A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Letters in Applied Microbiology.* 41: 482.
- ✓ Paape, M. J.; Wergin, W. P.; Guidry, A. J. 1981. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 137:555.
- ✓ Paape, M.J.; Shafer-Weaver, K.; Capuco, A.V.; Van oostveldt, K.; Burvenich, C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:259.
- ✓ Pankey, J. W.; Boddie, N. T.; Watts, J. L.; Nickerson, S. C. 1985. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J. Dairy Sci.* 68(3):726-731.
- ✓ Pellegrino, M. 2007. Mastitis Bovina: estudios del empleo de vacunas y probióticos en la prevención de la enfermedad. Primer informe del Doctorado en Ciencias Biológicas. Dpto. de Microbiología e Inmunología. FCEFQyN. UNRC.
- ✓ Pellegrino, M.; Giraud, J.; Raspanti, C.; Nagel, R.; Odierno, L.; Primo, V.; Bogni, C. 2008. Experimental trial in heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Veterinary Microbiology.* 127 (2008):186.

- ✓ Persson, K.; Larsson; I.; Hallen; S.C. 1993. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro, Vet. Immunol. Immunopathol. 37:99.
- ✓ Philpot W. N.; Nickerson S. C. 1993. Mastitis: El Contra Ataque. Publicado por Babson Bros. Co.
- ✓ Philpot, W.N. 2000. Strategies for controlling mastitis. Disertación pronunciada en el VII Congreso Panamericano de la Leche. FEPALE. La Habana. Cuba.
- ✓ Pillai, S. R.; Kunze, E.; Sordillo, L. M.; Jayarao, B. M. 2001. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. J. Dairy Sci. 84:1413.
- ✓ Quiñones Novoa, R. 2003. Evaluación epizootiológica y económica de la mastitis bovina en rebaños lecheros especializados de la provincia de Cienfuegos. Tesis en Opción al Título de Máster en Ciencias. Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez" Facultad de Medicina Veterinaria, Especialidad: Medicina Preventiva Veterinaria.
- ✓ Rainard, P.; Poutrel, B. 1982. Dynamics of nonclinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. Am. J. Vet. Res.; Vol 43, No. 12, pp. 2144-2146.
- ✓ Rainard, P. 1983. Experimental mastitis with *Escherichia coli*: sequential response of leukocytes and opsonic activity in milk of immunised and unimmunised cows. Ann. Rech. Vet. 14:281.
- ✓ Rainard, P.; Caffin; J.P. 1983. Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG₁, IgG₂, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into the udder of immunised and unimmunised cows. Ann. Rech. Vet. 14:271.
- ✓ Rainard, P.; Riollot, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. Review article. Vet. Res. 37:369.
- ✓ Rampone, H.; Giraudo, J.; Bogni, C.; Calzolari, A. 1993. Frequency of isolation of coagulase-negative staphylococci in normal and mastitis milk. Zentralbl Bakteriol. 279:537.
- ✓ REDVET. 2007. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504 2007 Volumen VIII Número 9.
- ✓ Reinoso, E.; Magnano, G.; Giraudo, J.; Calzolari, A.; Bogni, C. 2002. Bovine and rabbit models for study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant RC122. Can. J. Vet. 66(4):285.

- ✓ Rimbaud, E.; Lorenzo, P. 2005. Nuevas alternativas en el control de Mastitis: Inmunización del ganado con vacunas en base a exopolisacáridos. Conferencia dictada en el 8^{vo} Congreso Panamericano de la Leche en Miami.
- ✓ Rivero, V. B.; Vena, M. M.; Corbellini, C. N. 1984. Resultados Bacteriológicos en casos de Mastitis Clínicas en Rodeos Lecheros de la Cuenca del Abasto del Gran Buenos Aires. Rev. Agr. Prod. Anim. 4(2):211.
- ✓ Ruegg, P. 2002. Control de la mastitis. Novedades lácteas – Ordeño y calidad de la leche N°405. Instituto Babcock. Universidad de Wisconsin.
- ✓ Saran, A.; Chaffer, M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires.
- ✓ Schepers, A. J.; Lam, T. J.; Schukken, Y. H.; Wilmink, J. B.; Hanekamp, W. J. 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J. Dairy Sci. 80:1833.
- ✓ Schultze, W. D.; Paape, M. J. 1984. Effect of outcome of intramammary challenge exposure with *Staphylococcus aureus* of somatic cell concentration and presence of an intramammary device. Am. J. Vet. Res. 45(3):420.
- ✓ Schultze, W.D. and Bright S.C. 1983. Changes in penetrability of bovine papillary duct to endotoxin after milking, Am. J. Vet. Res. 44:2373.
- ✓ Sears, P. M.; Norcross, N. L.; Kenedy, K.; Smith, B.; Gonzales, R.; Romana, M. N. 1990. Resistance to *Staphylococcus aureus* infections in staphylococcal vaccinated heifers. In: Proc. Symp. on bovine mastitis. Indianápolis, USA.
- ✓ Selsted, M. E.; Tang, Y. Q.; Morris, P. A.; McGuire, M. J; Smith, W.; Henschen, A. H.; Cullor, H. S.. 1993. Purification, primary structures, and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. J. Biol. Chem. 268:6641.
- ✓ Seki, K.; Okasawara, M.; Sakurada, J.; Maurai, M.; Masura, S. 1987. Altered virulence of a pleiotropic *Staphylococcus aureus* mutant with low producibility of coagulase and others factors in mice. Inmul. 33(12):981.
- ✓ Shafer-Weaver, K. A.; Pighetti, G. M.; Sordillo, L. M. 1996. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 212:271.

- ✓ Shkreta, L.; Talbot, B. G.; Diarra, M. S.; Lacasse, P. 2004. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy herds. *Vaccine*. 23(1):114.
- ✓ Smith, K. L.; Hogan, J. S. 1997. Epidemiology of Mastitis. Proc. 3rd International Mastitis Seminar, Tel Aviv, Israel, Section 6, p.p.: 3.
- ✓ Sordelli, D. O.; Iglesias, M. F.; Cerquetti, M. C.; Catalano, M.; Hooke, A.M. 1993. Temperature-Sensitive Mutant of *Staphylococcus aureus*: Isolation and Preliminary Characterization. *Current Microbiol.* 27(3):125.
- ✓ Sordillo, L. M.; Nickerson, S. C.; Akers; R. M; Oliver; S. P.1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* 19:1165.
- ✓ Sordillo, L. M.; Nickerson, S. C.. 1988. Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.* 49:1112.
- ✓ Sordillo, L. M.; Nickerson, S. C.; Akers; R. M. 1989. Pathology of *Staphylococcus aureus* mastitis during lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. *J. Dairy Sci.* 72:228.
- ✓ Sordillo, L. M.; Shafer-Weaver, K.; DeRosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851.
- ✓ Sviland, S.; Waage, S. 2002. Clinical bovine mastitis in Norway. *Preventive Veterinary Medicine.* 54: 65.
- ✓ Talbot, B. G.; Lacasse, P. 2005. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock Production Science* 98:101.
- ✓ Tao, W.; Corbett, M.J.; Pickett, W. 1995. Monomeric bovine IgG₂ is a potent stimulus for bovine neutrophils. *J. Leuk. Biol.* 58:203.
- ✓ Targowski, S.P.; Klucinski, W. 1985. Effect of immune complexes from mastitic milk on blocking of Fc receptors and phagocytosis. *Infect. Immun.* 47:484.
- ✓ Targowski, S.P.; Niemialtowski, M. 1986. Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlactating secretion, and mastitic milk. *Am. J. Vet. Res.* 47:1940.
- ✓ Verbeet, M.P.; Vermeer, H.; Warmerdam, G.C.; de Boer, H.A.; Lee, S.H. 1995. Cloning and characterization of the bovine polymeric immunoglobulin receptor-encoding cDNA. *Gene* 164:329.

- ✓ Vestweber, J. G.; Leipold, H. W. 1993. Mastitis Bovina por *Staphylococcus aureus*. Primera parte: virulencia, mecanismos de defensa y establecimiento de la infección. Cont. Educ. 15:1561.
- ✓ Waage, S.; Mork, T.; Roros, A.; Aasland, D.; Hunshamar, A.; Odegaard, S. A. 1999. Bacteria Associated with Clinical Mastitis in Dairy Heifers. J. Dairy Sci. 82:712.
- ✓ Watson; D.L.; Lee; C.G. 1978. Immunity to experimental staphylococcal mastitis-comparison of live and killed vaccines. Austr. Vet. J. 54:374.
- ✓ Watson, D. L.; Schwartzkoff, C. L. 1990. A field trial to test the efficacy of a staphylococcal mastitis vaccine in commercial dairies in Australia. In: Int. Symp. Bovine Mastitis. Indianapolis, IN. Natl. Mastitis Counc.; Inc.; Arlington, VA and Am. Assoc. Bovine Pract.; W. Lafayette, IN. p.p.: 73.
- ✓ Watts, J.L.; Salmon, S.A.; Yancey, R.S.; Nickerson, S.C.; Weaver, L.J.; Hoemberg, C.; Pankey, J.W.; Fox, L.K. 1995. Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. J. Dairy Sci. 78: 1637.
- ✓ Watts, J. 1998. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16:620-627.
- ✓ Wellenberg, G. J.; van der Poel, W. H. M.; van Oirschot, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Veterinary Microbiology, Article 2361, p. 2-21.
- ✓ Wolter, W.; Castañeda, H.; Kloppert, B.; Zschock, M. 2004. Mastitis Bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Mastitis Bovina. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara, Jalisco. 16:62.
- ✓ Worku, M.; Paape, J.M.; Filep, R.; Miller; R.H. 1994. Effect of in vitro and in vivo migration of bovine neutrophils on binding and expression of Fc receptors of IgG₂ and IgM. Am. J. Vet. Res. 55:221.
- ✓ Yoshida, K.; Ichimn, Y.; Narikawa, S. 1984. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. J. Dairy Sci. 67:620.
- ✓ Zhang, G.; Young, J.R.; Tregaskes, C.A.; Sopp, P.; Howard, C.J. 1995. Identification of a novel class of mammalian Fc receptor. J. Immunol. 155:1534.



Universidad Nacional de Río Cuarto
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Microbiología e Inmunología
Orientación Genética Microbiana

Trabajo final

Carolina Belén García

Año 2008