



Departamento de Microbiología e Inmunología  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales  
Universidad Nacional de Río Cuarto

**“Evaluación de la eficacia de vacunación con la  
cepa *S. aureus* RC122 contra la mastitis bovina”**

**Nicolás Benito**

2015

El presente trabajo para optar al título de Microbiólogo fue realizado en el Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicoquímicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Tesista: Nicolás Benito

Directora: Dra. Cristina Inés Bogni

Co-Director: Dr. Matías Santiago Pellegrino

Aprobado por el Tribunal:

-----

**Dra. Cristina Bogni**

-----

**Dra. Mirta Lasagno**

-----

**Med. Vet. Melina Richardet**

*A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitir realizar mis estudios de grado.*

*A la Dra. Cristina Bogni, por su ayuda y coordinación en la elaboración de este trabajo final, además de aceptarme para formar parte de este gran grupo de investigación.*

*Al Dr. Matías Pellegrino, no sólo por su apoyo incondicional durante la realización del trabajo sino por haberse convertido en un compañero con el cual compartir inolvidables momentos.*

*A los Dres. Liliana Odierno, Claudia Raspanti, José Giraudo, y Mirta Lasagno por brindarme ayudas en la formación científica, intelectual y personal.*

*A mis papás, hermano, tíos y abuelos, por ser el motor indispensable para cumplir todas mis metas y objetivos.*

*A Eli, por ser el soporte fundamental y la compañía con la que compartí cada momento, dificultad y alegría en este largo proceso de aprendizaje.*

*A Nata, por cada momento compartido, por haber sido mi compañero, cómplice y sobre todo un gran amigo.*

*A mis amigos de la vida universitaria: German, Facu, Ana, Fer, Lumi, Jessi, Leila, Lore, por sus charlas, consejos y momentos inolvidables.*

*A mis amigos de la vida por todos los momentos vividos, por su acompañamiento, apoyo y compartir cada uno de mis logros.*

*A Fer y Stefy por su ayuda en la elaboración y edición del trabajo.*

*Al Dr. Carlos Valentini por sus aportes y conocimientos en veterinaria.*

*A las autoridades y personal docente y no docente de la UNRC que de alguna forma colaboraron en la realización de este trabajo.*

<b>Detalle</b>	<b>Pág.</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. IMPORTANCIA DEL SECTOR LECHERO</b>	<b>6</b>
1.1. Importancia a nivel mundial	6
1.2. Inserción mundial	6
1.3. Producción lechera en Argentina	6
<b>2. LECHE BOVINA</b>	<b>10</b>
2.1. Definición	10
2.2. Propiedades de la leche	10
2.3. Calidad de leche	11
2.3.1. Calidad higiénico-sanitaria	12
<b>3. MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA</b>	<b>13</b>
3.1. Estructura externa	13
3.2. Estructura interna	14
<b>4. INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA</b>	<b>15</b>
4.1. Mecanismos de defensa	15
4.2. Defensas Anatómicas	16
4.3. Defensas celulares	16
4.4. Factores de defensa solubles	18
4.5. Perspectivas futuras	20
<b>5. MASTITIS BOVINA</b>	<b>21</b>
5.1. Definición	21
5.2. Tipos de mastitis	21
5.3. Susceptibilidad a la mastitis	22
5.4. Impacto económico de la mastitis bovina sobre la producción lechera	22
5.5. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica.	23
5.6. Microorganismos causales de la mastitis bovina.	24
5.6.1. Patógenos contagiosos	24
5.6.2. Patógenos ambientales	25
5.6.3. Otros patógenos	25
<b>6. <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>27</b>
6.1. Características generales	27

6.2. Patogenia	27
7. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN.	28
8. VACUNAS	29
9. <i>Staphylococcus aureus</i> RC122	31
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. LISTADO GENERAL DE MATERIALES UTILIZADOS	35
1.1. Determinación de la producción de anticuerpos específicos (IgG total) en sangre y leche de animales inoculados.	35
1.2. Determinación de la capacidad opsonica de sueros de sangre de vacas y vaquillonas vacunadas con la mutante <i>S. aureus</i> RC122.	36
2. ESQUEMA DE VACUNACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	37
3. ACTIVACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA PRELIMINAR DE CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> RC122 Y RC108.	38
4. TOMA DE MUESTRA PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN SANGRE Y LECHE.	39
4.1. Toma de muestras de leche para ELISA.	39
4.2. Toma de muestras de sangre para ELISA.	39
5. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN SANGRE Y LECHE	40
5.1. Preparación del antígeno	40
5.2. Sensibilización de la policubeta	40
5.3. Bloqueo de la policubeta	41
5.4. Cuantificación de los anticuerpos	41
6. ENSAYO DE FAGOCITOSIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD OPSÓNICA DE SUEROS DE SANGRE	42
6.1. Ensayo de fagocitosis frente a cepas homólogas	42
6.1.1. Toma de muestras para fagocitosis	42
6.1.2. Marcado de <i>S. aureus</i> RC122 y <i>S. aureus</i> RC108 con FITC	42
6.1.3. Recuento en placa en superficie, para determinar concentración de microorganismos	42
6.1.4. Aislamiento de neutrófilos bovinos	43

6.1.5. Recuento total de neutrófilos	43
6.1.6. Recuento de neutrófilos viables (exclusión de Azul Tripán)	44
6.1.7. Ensayo de fagocitosis	44
6.2. Ensayo de fagocitosis frente a cepas heterólogas	45
7. ANÁLISIS DEL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE EN ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS	46
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS (IgG TOTAL) EN SANGRE Y LECHE DE ANIMALES INOCULADOS.	47
1.1. Titulación de los anticuerpos.	47
1.2. Niveles de IgG total en sangre de vacas y vaquillonas	47
1.3. Niveles de IgG total en leche de vacas y vaquillonas	52
2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD OPSÓNICA DE SUEROS DE SANGRE DE VACAS Y VAQUILLONAS VACUNADAS CON LA MUTANTE <i>S. aureus</i> RC122	56
2.1. Ensayo de fagocitosis frente a cepas homólogas	57
2.2. Ensayo de fagocitosis frente a cepas heterólogas	60
3. ANÁLISIS DEL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE EN ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS	63
3.1. Análisis de producción de leche	63
3.2. Análisis de infección	64
3.3. Análisis de Recuento Celular Somático (RCS)	66
<b>CONCLUSIÓN</b>	67
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	68

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Densidad de ganado vacuno e identificación de las principales cuencas lecheras pampeanas y extrapampeanas de la Argentina.	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> Cantidad de tambos y participación provincial de la producción de leche del total nacional.	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de la leche agrupada por rango de Recuento de bacterias y de células somática ( $\times 10^3$ ). Periodo mayo 2012-agosto 2013.	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b> Evolución del Recuento de Células Somáticas (RCS) y Recuento de bacterias (UFC) a Agosto 2015.	<b>13</b>
<b>Figura 5.</b> Morfología interna de la ubre bovina.	<b>14</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema de vacunación y toma de muestras de vacas inmunizadas con la cepa <i>S. aureus</i> RC122 para la realización del ensayo de vacunación e infección natural.	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Niveles de IgG total en <i>pool</i> de sangre de vacas y vaquillonas determinada por ELISA.	<b>48</b>
<b>Figura 8.</b> Niveles de IgG total en sangre de vacas determinada por ELISA.	<b>50</b>
<b>Figura 9.</b> Niveles de IgG total en sangre de vaquillonas determinada por ELISA.	<b>51</b>
<b>Figura 10.</b> Niveles de IgG total en leche de vacas y vaquillonas determinados por ELISA.	<b>53</b>
<b>Figura 11.</b> Niveles de IgG total en leche de vacas determinada por ELISA.	<b>54</b>
<b>Figura 12.</b> Niveles de IgG total en leche de vaquillonas determinada por ELISA.	<b>55</b>

- Figura 13.** Microfotografía de bacterias opsonizadas (con anticuerpos específicos de animales vacunados con la cepa *S. aureus* RC122) A: RC122 marcada con FITC. B: RC108 marcada con FITC. La fotografía fue obtenida a 1000X en microscopio de fluorescencia. **57**
- Figura 14.** Fagocitosis *in vitro* por neutrófilos bovinos de cepas de *S. aureus* A: Cepa RC122 fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne) y cepa RC122 libre. B: RC108 fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne) y RC108 libre. La fotografía fue obtenida a 1000X en microscopio de fluorescencia **58**
- Figura 15.** Índices de Fagocitosis (IF) frente a la cepa mutante de *S. aureus* RC122 y parental RC108 opsonizadas con *pools* de sueros de sangre de vacas y vaquillonas vacunadas, no vacunadas y ambas sin opsonizar. **59**
- Figura 16.** Fagocitosis *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus* A: *S. haemolyticus* fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne). B: *S. chromogenes* fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne). La fotografía fue obtenida a 100X en microscopio de fluorescencia. **61**
- Figura 17:** Índice de Fagocitosis (IF) frente a las cepas de *S. haemolyticus* y *S. chromogenes* opsonizada con *pools* de sueros sanguíneos de vacas y vaquillonas vacunadas con la cepa RC122, no vacunadas y sin opsonizar. **62**
- Figura 18.** Índice de Fagocitosis (IF) por neutrófilos bovinos contra diferentes cepas: RC122 (mutante utilizada para la vacunación), RC108 (cepa parental virulenta), *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *E. coli* y *S. uberis*. Las cepas fueron opsonizadas con *pools* de sueros sanguíneos pertenecientes al GV: grupo vacunadas, al GNV: grupo no vacunadas y SO: sin opsonizar, correspondientes a todos los tiempos de muestreo. **60**

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Cantidad de tambos por cuenca y representatividad nacional.	<b>8</b>
<b>Tabla 2.</b> Funciones biológicas de las principales poblaciones celulares presentes en la glándula mamaria bovina.	<b>18</b>
<b>Tabla 3.</b> Funciones biológicas de algunos de los componentes solubles de la glándula mamaria	<b>19</b>
<b>Tabla 4.</b> Media de la producción de leche (en litros), número de animales utilizados y el p-valor obtenido en el análisis estadístico ANOVA para los Grupos Vacunados y No Vacunados.	<b>63</b>
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de infección por miembros de la Familia <i>Staphylococcaceae</i> obtenido para vacas y vaquillonas de los Grupos Vacunados y No Vacunados. SNC: <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos	<b>64</b>
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de infección por otros microorganismos productores de mastitis bovina en vacas y vaquillonas pertenecientes a los Grupos Vacunados y No Vacunados.	<b>65</b>
<b>Tabla 7.</b> Logaritmo de las medias de RCS obtenidos para vacas y vaquillonas del Grupo Vacunados y del Grupo No Vacunados. P-valor obtenido al realizar el análisis estadístico ANOVA.	<b>66</b>

## Abreviaturas

<b>Ac:</b>	Anticuerpo
<b>ACD:</b>	Anticoagulante Ácido-Citrato-Dextrosa
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Amp:</b>	Amperes
<b>BHI:</b>	Caldo infusión cerebro-corazón
<b>c.s.p:</b>	Cantidad suficiente para
<b>Ca:</b>	Calcio
<b>CD4+:</b>	<i>Cluster</i> de diferenciación 4 (Linfócitos T cooperadores)
<b>CD8+:</b>	<i>Cluster</i> de diferenciación 8 (Linfócitos T citotóxicos)
<b>cél:</b>	Células
<b>Cl:</b>	Cloro
<b>ClNa:</b>	Cloruro de sodio
<b>CMH:</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>CMH-I:</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I
<b>CMH-II:</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II
<b>CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>:</b>	Carbonato
<b>CSF:</b>	Factor estimulante de colonia.
<b>D1:</b>	Dosis 1
<b>D2:</b>	Dosis 2
<b>D3:</b>	Dosis 3
<b>DO:</b>	Densidad óptica
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA:</b>	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Enzimoimmunoanálisis)
<b>ETA:</b>	Toxina exfoliativa A
<b>ETB:</b>	Toxina exfoliativa B
<b>Fc:</b>	Fragmento de las Ig cristalizable correspondiente al extremo C-terminal
<b>FEC:</b>	Factor estimulador de colonias
<b>FITC:</b>	Isotiocianato de fluoresceína isómero I
<b>g:</b>	Gramos
<b>GNV:</b>	Grupo no vacunado
<b>GV:</b>	Grupo vacunado
<b>h:</b>	Horas
<b>has:</b>	Hectáreas
<b>IF:</b>	Índice de fagocitosis
<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina
<b>IgA:</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgG:</b>	Inmunoglobulina G

<b>IgG<sub>1</sub></b> :	Inmunoglobulina G <sub>1</sub>
<b>IgG<sub>2</sub></b> :	Inmunoglobulina G <sub>2</sub>
<b>IgM</b> :	Inmunoglobulina M
<b>IIM</b> :	Infección intramamaria
<b>IL</b> :	Interleuquina
<b>IM</b> :	Intramamaria
<b>INF</b> :	Interferón
<b>K</b> :	Potasio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> :	Fosfato de potasio
<b>lts</b> :	Litros
<b>MEM</b> :	Medio esencial mínimo
<b>Mg</b> :	Magnesio
<b>min</b> :	Minutos
<b>ml</b> :	Mililitros
<b>mm<sup>3</sup></b> :	Milímetros cúbicos
<b>MNNG</b> :	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidina
<b>mo</b> :	Microorganismos
<b>Na</b> :	Sodio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> :	Fosfato de sodio
<b>NaCO<sub>3</sub></b> :	Carbonato de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> :	Bicarbonato de sodio
<b>NK</b> :	<i>natural killer</i>
<b>nm</b> :	Nanómetros
<b>NO</b> :	Óxido nítrico
<b>Nº</b> :	Número
<b>P/V</b> :	Peso/Volumen
<b>PBS</b> :	Buffer salino fosfato
<b>pH</b> :	Potencial hidrógeno
<b>RCS</b> :	Recuento de células somáticas
<b>ROIs</b> :	Intermediarios reactivos del oxígeno
<b>rpm</b> :	Revoluciones por minuto
<b>SC</b> :	Subcutánea
<b>SCN</b> :	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos
<b>seg</b> :	Segundos
<b>SF</b> :	Solución fisiológica
<b>SO</b> :	Sin opsonizar
<b>TLRs</b> :	Receptores tipo Toll

## Abreviaturas

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TSA:** Agar tripticasa soya

**TSB:** Caldo tripticasa soya

**TST:** Toxina del shock tóxico

**μl:** Microlitros

**ufc:** Unidades formadoras de colonias

**μg:** Microgramos

**Σ:** Sumatoria

Las provincias de Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires constituyen las cuencas lecheras más importantes del país. La producción nacional de leche fue de 11.338 millones de litros en el año 2012, volumen que fue destinado en un 78% y 22% al consumo interno y la exportación, respectivamente. El mejoramiento de la calidad de la leche y sus derivados es prioritario debido al aumento de la capacidad exportadora del sector, principalmente en el Mercosur. Adicionalmente, son cada vez mayores las presiones del consumidor para el mejoramiento de la calidad de los productos.

La mastitis, definida como la inflamación de la glándula mamaria, se incluye entre las enfermedades prevalentes del ganado bovino lechero. En Argentina, más del 80% de las mastitis son originadas por microorganismos, siendo los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* los que producen más del 90% de las infecciones intramamarias. Un gran número de estrategias se han desarrollado en el mundo con el objetivo de minimizar los problemas ocasionados por la enfermedad. La desinfección pre y post-ordeño y la terapia con antibióticos, son los métodos de control más utilizados. A ello se suma el aumento en la frecuencia de cepas resistentes a antibióticos y las presiones cada vez mayores por parte de los entes reguladores para limitar el uso de los mismos en el ganado. En las últimas décadas, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de medidas preventivas alternativas y complementarias a las mencionadas, como un enfoque racional para reducir la utilización de antibióticos. El desarrollo de vacunas para incrementar la resistencia a la enfermedad, prevenirlas en algunos casos y reducir sus efectos clínicos, ha sido objeto de numerosas investigaciones.

En el laboratorio de Genética Microbiana de la UNRC se decidió incursionar en la búsqueda de mutantes atenuadas en su virulencia con potencialidad para su uso como cepas vacunales. De ellas, la mutante de *S. aureus* RC122, obtenida por mutación química, mostró características adecuadas que incluyen una menor virulencia (1350 veces menor que la cepa parental), un crecimiento *in vitro* ligeramente menor y una producción disminuida de varias exoproteínas involucradas en la virulencia con relación a la cepa parental.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de la vacunación con la cepa avirulenta *S. aureus* RC122 en un rodeo lechero comercial utilizando un plan de vacunación que involucre tres dosis SC antes del parto.

En primer lugar, se cuantificaron los niveles de IgG total a partir de las muestras de sangre y leche obtenidas de animales vacunados y no vacunados. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en los niveles de anticuerpos luego de la administración de cada una de las dosis subcutáneas (D1, D2 y D3). Además, los niveles en los anticuerpos fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en el grupo vacunados (GV) respecto de grupo no vacunados (GNV) en todos los tiempos de muestreo de cada análisis, excepto para el tiempo 7 post-parto en vaquillonas.

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de leche de la población total de bovinos, mostraron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el título de anticuerpos en los tiempos 7, 14, 60 y 90 con respecto al GNV. En el análisis de vacas se observa diferencia significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) únicamente en los tiempos 14, 60 y 90 post-parto. En el análisis de vaquillonas en los tiempos 7, 14, 60 y 90 post-parto.

Por otro lado, se llevó a cabo un ensayo de fagocitosis, en el que cepas homólogas (*S. aureus* RC108 y *S. aureus* RC122) y heterólogas (*S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *E. coli* y *S. uberis*) previamente marcadas con FITC se homogeneizaron con pools de sueros de sangre obtenidos de vacas de los GV y GNV y se mezclaron con neutrófilos bovinos.

Los resultados obtenidos mostraron un IF superior con los *pools* de sueros del GV con respecto al GNV en los ensayos con las cepas de *S.aureus* RC122 y RC108, *S.chromogenes* y *S. haemolyticus*. Los resultados obtenidos con las cepas de *E. coli* y *S. uberis* no mostraron diferencias entre los IF obtenidos con los *pools* de sueros del GV con respecto al GNV.

Finalmente, con el fin de determinar la influencia de la vacunación en la producción de leche, Recuento Celular Somático e incidencia de infecciones se realizó un análisis de estos parámetros a los 60 días post-parto. En el análisis de producción de leche se encontró diferencia significativa mayor ( $p < 0,05$ ) en los animales del GV respecto a los GNV. Por otro lado, en el análisis de incidencia de infección, se observó un porcentaje de infección por *Staphylococcus spp.*, dos veces superior en el GNV al observado en el GV. Estos resultados en conjunto con el mayor IF encontrado en el GV respecto del GNV, estaría indicando que la vacunación sería capaz de brindar un cierto grado de protección contra las infecciones por cepas de *Staphylococcus spp.*

## 1. IMPORTANCIA DEL SECTOR LECHERO

### 1.1. Importancia a nivel mundial

La ganadería es actualmente el sector agrario que más superficie ocupa en el mundo, y las previsiones estiman que será el sector más importante de valor agregado para el año 2020. Debido al aumento de la población y a los cambios alimenticios continuos, se espera que entre el año 2007 y 2020 la demanda total de leche crezca un 25% [FAO, 2007].

La producción de leche en el mundo es de gran magnitud (765 millones de toneladas por año), está muy regionalizada y se ha mantenido relativamente estable en los últimos años, a pesar de las dificultades de orden económico y social que se presentan a nivel mundial [Campbell y col., 2013]. Así, la leche de vaca representa el 83,9% de la producción mundial total, seguida por la de búfalo (12,6%), la de cabra (2%), la de oveja (1,3%) y otros animales (0,2%) [FAO, 2007; Campbell y col., 2013].

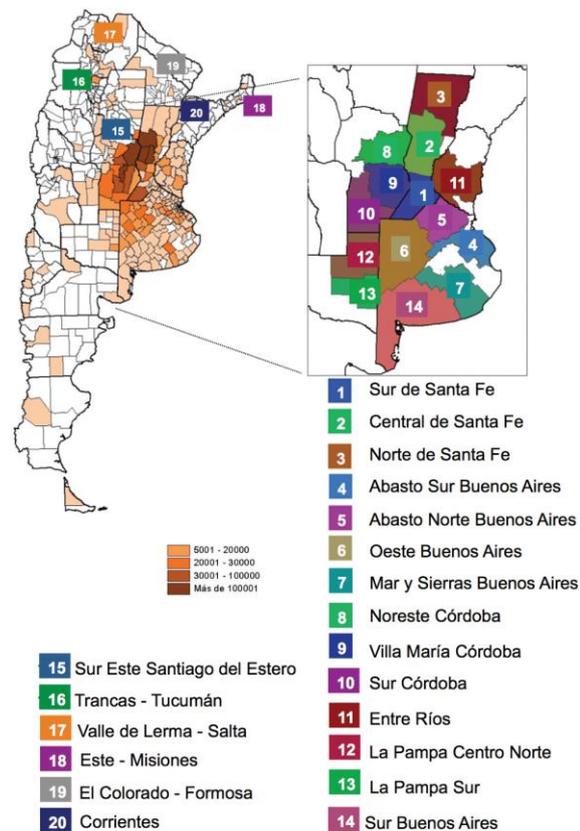
### 1.2. Inserción mundial

Sobre la base de datos de Naciones Unidas [UN-Comtrade] se estima que en 2012 las exportaciones mundiales de productos lácteos alcanzaron los 12 millones de toneladas, por un valor aproximado de US\$ 36.000 mil millones. Del monto total, unos 10.000 millones de toneladas correspondieron a quesos, 8.000 a leche en polvo entera, 6.000 a leche en polvo descremada, 3.500 a manteca y 3.200 a lactosuero.

En el período 2003-2012, el valor de las exportaciones de las principales compañías lácteas exhibió una impresionante expansión del 211%. En este contexto tan favorable, resulta evidente que en los últimos años la Argentina ha logrado posicionarse como uno de los jugadores más destacados en el mercado mundial [Campbell y col., 2013].

### 1.3. Producción lechera en Argentina

La producción e industrialización de la leche son actividades tradicionales de la Argentina, responsables en gran medida del desarrollo económico y social de numerosas regiones del país. La Figura 1 permite identificar claramente la región con mayor concentración de animales del país, la cual está conformada por los departamentos del centro-oeste de la provincia de Santa Fe y del centro-este de Córdoba. Este territorio productivo se genera a partir de la colonización europea, transformándose en una de las regiones más importantes de Sur y Centro América en términos de producción e industrialización de leche. [Campbell y col., 2013].



**Figura 1.** Densidad de ganado vacuno e identificación de las principales cuencas lecheras pampeanas y extrapampeanas de la Argentina [Campbell y col., 2013]

El territorio productivo argentino se encuentra distribuido a lo largo del país en cuencas para facilitar su análisis y organización. En la Tabla 1 se muestra para cada cuenca el número de tambos, su relevancia a nivel nacional (%), la cantidad de establecimientos definidos como “pequeños” y su representatividad, valor que permite una aproximación a la característica de tamaño de los tambos por zona. [Campbell y col., 2013]. En dicha tabla, es posible observar la importancia de la cuenca de Villa María, Córdoba, en relación a la cantidad de tambos y su representatividad en el país, colocándose en tercera posición luego de la cuenca Santa Fe Central y Córdoba Norte.

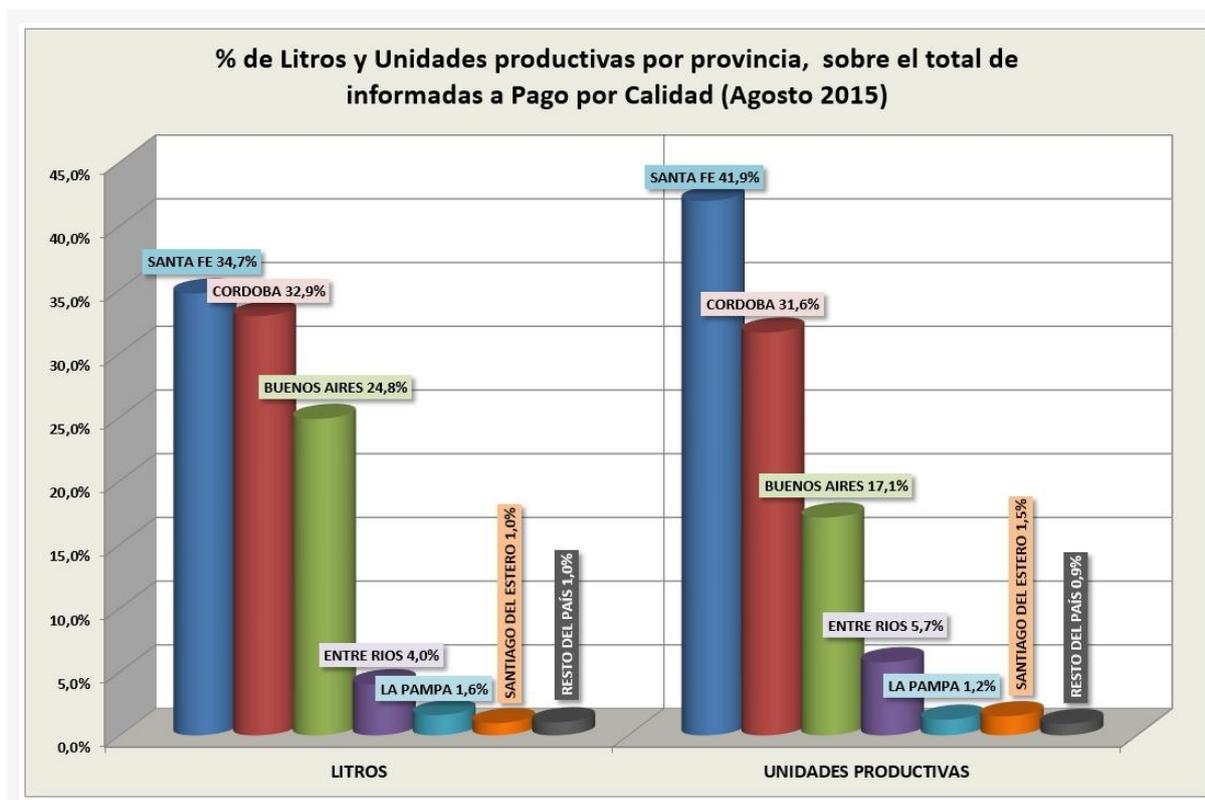
**Tabla 1.** Cantidad de tambos por cuenca y representatividad nacional: [Campbell y col., 2013]

Cuencas lecheras	Tambos por cuenca (unidad)	Total Nacional	Tambos <100 has por cuenca	Total de la cuenca
1 Sur Santa Fe	324	2,80%	110	33,95%
2 Central Santa Fe	3.471	29,90%	1.453	41,86%
3 Norte Santa Fe	63	0,50%	41	65,08%
4 Abasto Sur Buenos Aires	812	7,00%	424	52,22%
5 Abasto Norte Bs. As	393	3,30%	205	52,16%
6 Oeste Bs. As	1.036	8,92%	352	33,98%
7 Mar y Sierras Bs. As.	182	1,57%	47	25,82%
8 Córdoba Norte	1.977	17,01%	493	24,94%
9 Villa María Córdoba	1.178	10,14%	285	24,19%
10 Sur Córdoba	353	3,04%	110	31,16%
11 Entre Ríos	610	5,25%	468	76,72%
12 La Pampa Centro Norte	62	0,53%	21	33,87%
13 La Pampa Sur	145	1,25%	25	17,24%
14 Buenos Aires Sur	145	1,25%	77	53,10%
15 Sur Este Santiago del Estero	146	1,26%	13	8,90%
16 Trancas Tucumán	56	0,48%	17	30,36%
17 Valle de Lerma Salta	45	0,39%	9	20,00%
18 Este Misiones	416	3,58%	-	-
19 El Colorado-Formosa	100	0,86%	-	-
20 Corrientes	106	0,91%	-	-

Como la producción está agregada considerando los límites provinciales, en la Figura 2, se presenta la cantidad de tambos y la producción por provincia. Tal como puede observarse, las provincias pampeanas concentran más del 95% de los tambos, siendo las de mayor relevancia Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires. [MAGyP, 2015].

La producción de leche hasta agosto de 2015 es liderada por Santa Fe (34,7%), seguida por Córdoba (32,9%) y Buenos Aires (25%). Las restantes provincias productoras aportan en su conjunto el 6% del total nacional. [MAGyP, 2015]. Santa Fe es la principal provincia lechera del país, tanto por su volumen de producción como por la importancia que tradicionalmente tuvo la actividad en el desarrollo de algunas ciudades. La provincia de Córdoba participa con un tercio de la producción nacional, por lo que se ubica en el segundo escalón de las provincias productoras de leche del país. Dentro de sus tres cuencas con que cuenta la provincia, la de mayor importancia en producción es la Cuenca de Villa María.

Buenos Aires es la tercera provincia en cuanto a la producción de leche cruda y su participación relativa en el total nacional se ha ido reduciendo a favor de la mayor participación de Santa Fe. Entre Ríos ocupa el cuarto lugar como productora de leche en el país. A partir de la década del 90 se observó una retracción en la producción. El quinto lugar es ocupado por la provincia de La Pampa que cuenta con una cuenca que a su vez puede ser dividida en 2 (Norte-centro y Sur), ubicadas en la franja oriental de la provincia.



**Figura 2.** Cantidad de tambos y participación provincial de la producción de leche del total nacional. [MAGYP, 2015]

La producción nacional de leche fue de 11.338 millones de litros en el año 2012 volumen que fue destinado en un 78% y 22% al consumo interno y a la exportación, respectivamente [MAGyP, 2015].

Como se describió anteriormente, queda en evidencia la importancia que tienen las provincias de Santa Fe y Córdoba en el sector lechero, por lo que es de gran relevancia mantener en las condiciones adecuadas no sólo la infraestructura productiva sino también la sanidad animal.

## 2. LECHE BOVINA

### 2.1. Definición

El Código Alimentario Argentino, define a la leche como el producto obtenido del ordeño total e ininterrumpido de vacas lecheras en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y autorizados por la Autoridad Bromatológica Sanitaria Jurisdiccional, sin el agregado de ningún tipo de aditivos.

La leche es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos [Knight, 1991; Sandholm y col., 1995]. La principal función de la leche es la de nutrir a las crías hasta que sean capaces de digerir otros alimentos. Además protege el tracto gastrointestinal de la inflamación producida por patógenos y toxinas y contribuye a la salud regulando los procesos de obtención de energía [Besser y Gay, 1994]. La leche es el único fluido que ingieren las crías de los mamíferos hasta el destete, por lo que su producción ocurre inmediatamente después del parto.

### 2.2. Propiedades de la leche

La leche de vaca tiene una densidad media de 1,032 g/l. La leche posee un pH ligeramente ácido (entre 6,6 y 6,8) y una acidez, o cantidad de ácido láctico, de 0,15% a 0,16% de la leche. Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases: **solución** (minerales e hidratos de carbono disueltos en agua), **suspensión** (sustancias proteicas en agua en suspensión) y **emulsión** (grasa emulsificada en agua). Contiene cerca de un 87% de agua, mientras que el resto lo constituye el extracto seco (similar al de un alimento sólido, alrededor de 130 g/l) compuesto de 35 g a 45 g de materia grasa. [Sandholm y col., 1995]

La leche es un producto nutritivo complejo que posee componentes orgánicos (glúcidos, proteínas, lactosa, lípidos, vitaminas) y minerales (Ca, Na, K, Mg, Cl). Las sustancias orgánicas están presentes en cantidades más o menos iguales y constituyen la principal fuente de energía. Estos nutrientes se reparten en elementos constructores, las proteínas, y en compuestos energéticos, los glúcidos y los lípidos.

Entre los componentes orgánicos se incluyen:

**Hidratos de carbono:** el principal es la lactosa. Su concentración es relativamente constante (5%) y similar en todas las razas de vacas lecheras.

**Proteínas:** Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). La caseína se encuentra dispersa como un gran número de

pequeñas partículas sólidas que permanecen en suspensión. Estas partículas se llaman micelas y la dispersión de las mismas en la leche se llama suspensión coloidal.

Dentro de las proteínas séricas o del suero tenemos la  $\alpha$ -**lactoalbúmina** (constituye el sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa), la  $\beta$ -**lactoglobulina** y las **inmunoglobulinas** (constituyen el 10% del total de las proteínas del suero y provienen de la sangre del animal). [Delouis y Richard, 1991].

**Grasa:** Normalmente, la grasa (o lípido) constituye del 3,5% al 6,0% de la leche, dependiendo de la raza y de las prácticas de alimentación. La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión. Los ácidos grasos de cadena larga son principalmente los insaturados (deficientes en hidrógeno), siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), y los polinsaturados linoleico y linolénico [Sandholm y col., 1995].

**Vitaminas:** podemos encontrar una gran variedad de vitaminas en la leche que varían en concentración y actividad, entre ellas: A (30  $\mu\text{g}$  / 100 ml), D (0,06  $\mu\text{g}$  / 100 ml), E (88 g / 100 ml), K (17  $\mu\text{g}$  / 100 ml), B1 (37  $\mu\text{g}$  / 100 ml), B2 (180  $\mu\text{g}$  / 100 ml), B6 (46  $\mu\text{g}$  / 100 ml), B12 (0,42  $\mu\text{g}$  / 100 ml), C (1,7  $\mu\text{g}$  / 100 ml). [Besser y Gay, 1994].

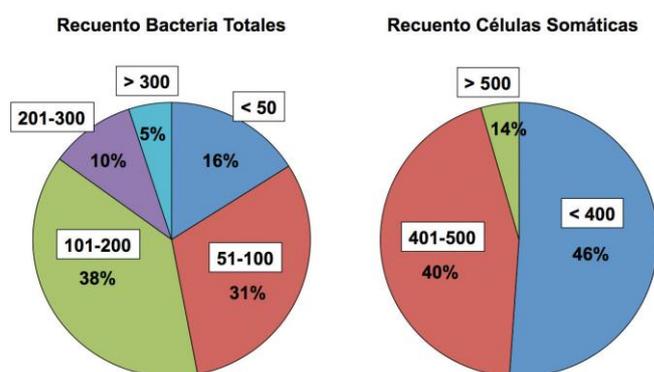
Otro componente importante son las células somáticas (células del sistema inmune y de descamación). Estas juegan un papel importante en la leche, ya que son un indicador directo de la salud de la ubre. Generalmente un aumento significativo en el recuento de estas células (RCS) se observa durante procesos inflamatorios, infecciosos o traumáticos.

### 2.3. Calidad de leche

El logro del conjunto de atributos que definen la inocuidad, aptitud tecnológica y calidad de leche ha sido una de las prioridades de la cadena láctea argentina. La vigencia de un sistema de calificación y pago de la leche por su calidad a los productores data de la década de 1960, situación que ha tenido modificaciones y actualizaciones en el transcurso del tiempo [Campbell y col., 2013]. Actualmente está en proceso de instrumentación un sistema de liquidación única que estandariza los parámetros de calidad y define las pautas sobre las que deben trabajar los laboratorios de análisis. [Campbell y col., 2013].

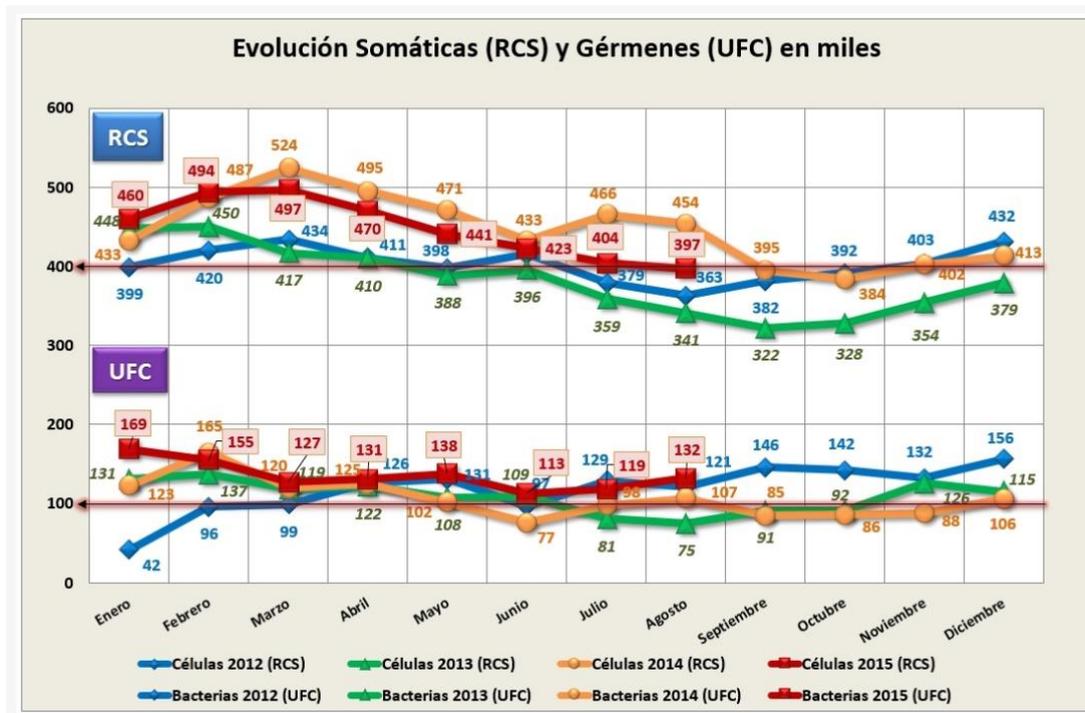
### 2.3.1. Calidad higiénico-sanitaria

En la Figura 3 se observa la leche producida en Argentina en el período mayo 2012-agosto 2013 por rangos de recuentos de bacterias y de células somáticas, dos de los parámetros más importantes que definen la calidad higiénico-sanitaria de la leche. Se puede observar que el 50% de la leche se encuentra con  $< 100$  mil / ml bacterias y  $< 400$  mil / ml células somáticas. Los umbrales que determinan una leche técnicamente procesable sin problemas tecnológicos son  $< 200$  mil / ml bacterias y  $< 500$  mil células, considerando este último valor se puede afirmar que el 90% de la leche producida en nuestro país presenta esa calidad. Esta información demuestra una muy importante evolución de la calidad higiénico sanitaria de la leche producida en los últimos años, explicada por el importante trabajo de transferencia y capacitación, por las inversiones en bienes de capital realizadas por los productores (equipos de frío, ordeñadores actualizadas técnicamente) y por los sistemas de pago de la leche por calidad. [Campbell y col., 2013.]



**Figura 3.** Porcentaje de la leche agrupada por rango de Recuento de bacterias y de células somática ( $\times 10^3$ ). Período mayo 2012-agosto 2013. [MAGyP, 2013]

Por su parte, datos de la producción lechera hasta agosto 2015 [MAGyP, 2015], según se expresan en la Figura 4, determinan un aumento en el recuento de células somáticas en 2014 y 2015 con respecto a los años 2012 y 2013, principalmente en los primeros meses del año; observándose una disminución en los meses finales 2014. El recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) se mantuvo alto al comienzo del año, pero con una tendencia a disminuir hacia el final del mismo.



**Figura 4.** Evolución del Recuento de Células Somáticas (RCS) y Recuento de bacterias (UFC) a Agosto 2015. [MAGyP 2015]

### 3. MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

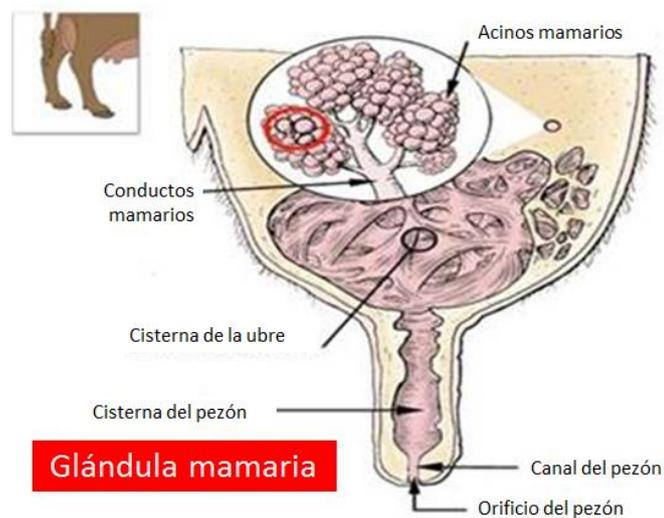
La ubre representa el conjunto de cuatro glándulas de origen dérmico, considerada como una glándula sudorípara modificada, presentando una apariencia secular redondeada.

#### 3.1. Estructura externa

Cubierta por una piel suave al tacto y provista de vellos finos, excepto en los pezones, la ubre se encuentra adherida a la cavidad abdominal, por fuera del cuerpo, por medio del aparato suspensorio. La glándula mamaria está formada por cuatro glándulas íntimamente relacionadas pero separadas por una membrana específica que divide las anteriores de las posteriores, sin embargo, cada una presenta un conjunto de conductos que permiten la llegada de la leche hasta el seno lactífero glandular [Tellez y Romero, 2015]. Las glándulas mamarias posteriores o caudales son mayores que las anteriores y contienen de un 25% a un 50% más de tejido secretor, pudiendo llegar a producir el 60% de la leche secretada [Smith, 1968].

### 3.2. Estructura interna

El parénquima glandular está dividido en pequeños lóbulos por septos interlobulares que derivan de membranas que conforman el aparato suspensorio. Estos septos son muy ricos en vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, lo que permite una adecuada irrigación sanguínea, linfática y sensorial a la glándula. Cada lóbulo se encuentra dividido en lobulillos que en su interior se observan entre 150 a 220 alveolos separados entre sí por venas, arterias y lámina propia. Los alvéolos se vacían mediante pequeños ductos en unos túbulos llamados ductos intralobulilares, que desembocan en un espacio colector central, del cual emergen los ductos interlobulilares o galactóforos que vierten la leche en los llamados conductos lactíferos [Schmidt, 1974; Delouis y Richard, 1991; Pellegrino, 2010] Estos conductos atraviesan el parénquima y llevan la leche de los alvéolos hasta el seno lactífero [Schwarse y Schroider, 1984]. El seno lactífero se halla dividido irregularmente por pliegues de la mucosa en una porción glandular o cisterna de la ubre y una porción papilar o cisterna del pezón. Cada cisterna del pezón culmina en una estructura llamada canal del pezón, formado por fuertes músculos que permanecen cerrados impidiendo la entrada o salida de cualquier material, mediante el cual la leche, previa estimulación, puede alcanzar el medio externo.



**Figura 5.** Morfología interna de la ubre bovina. [Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño (consultado febrero 2015)]

## 4. INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA

### 4.1. Mecanismos de defensa

La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa, que se pueden separar en dos categorías distintas: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata, es la defensa predominante durante las primeras etapas de la infección [Sordillo, 1997; Stelwagen y col., 2009; Alnakip y col., 2014].

Este tipo de respuesta está presente o se activa rápidamente en el sitio de la infección por numerosos estímulos, pero no aumentan por la exposición repetida al mismo.

Si los mecanismos de defensa innatos funcionan adecuadamente, la mayoría de los patógenos se eliminan fácilmente en un corto período de tiempo y antes de que ocurra la activación del sistema inmune adaptativo. La rápida eliminación de las bacterias a menudo no da lugar a cambios notables en la calidad de la leche o en la producción. [Porcherie y col., 2012].

La inmunidad innata de la glándula mamaria está mediada por barreras físicas de la ubre, macrófagos, neutrófilos, células NK y ciertos factores solubles. Si un patógeno es capaz de evadir o no es completamente eliminado por el sistema de defensa innato, la inmunidad adaptativa se activa. Esta reconoce determinantes antigénicos específicos de un patógeno [Sordillo y Streicher, 2002]. Este reconocimiento está mediado por anticuerpos, macrófagos, y varias poblaciones linfoides [Sordillo, 1997]. En comparación con la primera exposición a un antígeno bacteriano, una respuesta de memoria sería mucho más rápida, considerablemente más fuerte, más duradera, y a menudo más eficaz para eliminar el patógeno. Los protocolos de vacunación se basan en estas características únicas de la respuesta inmune adquirida. El sistema inmune es capaz de reaccionar selectivamente sólo a antígenos extraños a través de diversas proteínas unidas a la membrana, llamadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) [Sordillo y Streicher, 2002]. Una respuesta inmune adaptativa sólo se producirá si los antígenos se combinan con una molécula de CMH en la superficie de ciertas células, un proceso referido como presentación de antígeno [Sordillo y Streicher, 2002].

En la glándula mamaria, es necesario que tanto la inmunidad innata como la inmunidad adquirida sea altamente coordinada con el fin de proporcionar una protección óptima de mastitis [Alnakip y col., 2014]

### 4.2. Defensas Anatómicas

La punta del pezón se considera la primera línea de defensa contra la mastitis ya que es la ruta por la cual los patógenos invasores pueden ganar la entrada a la glándula mamaria. El pezón contiene músculos del esfínter cuya función es mantener el cierre hermético entre los ordeños y obstaculizar la penetración de bacterias [Alnakip y col., 2014].

El canal del pezón presenta queratina, que es crucial para el mantenimiento de la función de barrera en la punta del pezón. La queratina del pezón es un material ceroso que se origina en epitelio escamoso estratificado. La acumulación de queratina puede proporcionar una obstrucción física a las bacterias, dificultando su migración a la cisterna de la glándula mamaria [Alnakip y col., 2014].

Dentro del revestimiento de queratina existen agentes antimicrobianos como ésteres y ácidos grasos no esterificados que presentan actividad bacteriostática. Entre ellos se encuentran el ácido mirístico, ácido palmitoleico, y el ácido linoleico. Las proteínas catiónicas asociadas al revestimiento de queratina pueden unirse electrostáticamente a patógenos causantes de mastitis, alterando sus paredes celulares, y haciéndolos más susceptibles a la presión osmótica. Se han documentado funciones de centinela del pezón, como expresión de varios receptores tipo Toll (TLRs), la producción de citoquinas y péptidos antimicrobianos [Sordillo y Steincher, 2002; Whelehan y col., 2011].

### 4.3. Defensas celulares

Si las bacterias son capaces de superar las defensas anatómicas proporcionadas por la punta del pezón, todavía deben evadir las actividades antibacterianas de la glándula mamaria antes de establecer la enfermedad. [Sordillo y Streincher, 2002].

Los neutrófilos son leucocitos reclutados activamente al sitio de la infección y son el tipo de célula principal que se encuentra en los tejidos mamarios y secreciones durante la etapa temprana del proceso inflamatorio asociado con la infección bacteriana. Mientras que el número de neutrófilos es relativamente bajo en la glándula mamaria sana ( $<10^5$  células / ml), estos valores pueden aumentar ( $> 10^6$  células / ml) constituyendo más del 90% de la población de leucocitos en la glándula mamaria durante la mastitis.

Estas células se desplazan desde la sangre a la glándula mamaria con el fin de fagocitar y matar los agentes patógenos y producen un efecto bactericida mediante la producción de radicales hidroxilo y radicales libres del oxígeno. [Sordillo, 2005; Singh y col., 2008].

Los macrófagos representan el tipo celular dominante en la leche y los tejidos de una glándula mamaria saludable. [Sordillo, 2005; Ten Napel y col., 2009]. Similar a los

neutrófilos, las funciones de los macrófagos son fagocitar bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactiva del oxígeno [Sordillo, 2005; Denis y col., 2006]. La tasa de fagocitosis se puede aumentar dramáticamente en presencia de anticuerpos opsonicos, aunque el número de macrófagos en la ubre tiende a ser más bajo durante la inflamación, posiblemente disminuyendo su tasa de fagocitosis en comparación con los neutrófilos [Sordillo, 2005]. Los macrófagos activados liberan prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas que pueden aumentar en gran medida los procesos inflamatorios locales. Además, desempeñan un papel en el desarrollo de respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación de antígenos en asociación con el CMH de clase II [Sordillo, 2005].

Los linfocitos son las únicas células del sistema inmune que reconocen antígenos a través de receptores de membrana específicos para los patógenos invasores. Hay dos subconjuntos de linfocitos, linfocitos T y B, que difieren en funciones y productos proteicos [Alnakip y col., 2014].

Los linfocitos T se pueden subdividir en linfocitos T CD4+ (T-helper) y CD8+ (T citotóxico o supresor) [Sordillo, 1997]. En las glándulas mamarias bovinas, predomina el fenotipo CD8+, en contraste con la sangre periférica, que tiene principalmente el fenotipo CD4+. Durante la mastitis, los linfocitos T CD4+ prevalecen y se activan en respuesta al reconocimiento del complejo antígeno-CMH II en células presentadoras de antígeno [Sordillo, 2005]. La función de estas células es la de activar linfocitos y macrófagos a través de la producción de ciertas citoquinas. Dependiendo del tipo de citoquinas secretadas, la respuesta puede ser del tipo Th1 o mediada por células (IL-2, INF $\gamma$ ) o del tipo Th2 o mediada por anticuerpos (IL-4, IL-5, IL-10) o Th17 [Sordillo, 2005; Chabalgoity y col., 2007].

Los linfocitos T CD8+ pueden tener funciones citotóxicas o supresoras. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos tienen la función de eliminar células que expresan antígenos foráneos presentados en moléculas del CMH-I. También actúan como células *scavengers* que destruyen células secretorias viejas, las cuales en número elevado aumentan la susceptibilidad de la glándula mamaria a la mastitis. La función principal de los linfocitos T CD8+ supresores es la de controlar o modular la respuesta inmune durante las infecciones bacterianas, mientras que la de los linfocitos B es la producir anticuerpos [Alnakip y col., 2014].

Además, los linfocitos B pueden funcionar como células presentadoras de antígeno a medida que interiorizan, procesan y presentan antígenos vía moléculas CMH-II a linfocitos T. Seguido de esto, las citoquinas derivadas de los linfocitos T cooperadores, fundamentalmente IL-2, IL-4 e IL-21, pueden potenciar la proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos [Sordillo y Streincher, 2002].

En la Tabla 2, se sintetizan los componentes celulares y sus funciones, capaces de mediar tanto la inmunidad innata como adquirida.

**Tabla 2.** Funciones biológicas de las principales poblaciones celulares presentes en la glándula mamaria bovina. [Sordillo y Streicher, 2002.]

Componente celular	Función biológica
<b>Neutrófilos</b>	Fagocitosis y muerte intracelular de la bacteria; secreción de factores antimicrobianos.
<b>Macrófagos</b>	Fagocitosis y muerte intracelular de la bacteria; presentación de antígenos
<b>Linfocitos T</b> <i>CD4+ (colaboradores)</i>  <i>CD8+ (citotóxicos)</i>	Producción de citoquinas proinflamatorias luego del reconocimiento de antígenos presentados en moléculas del CMH II; células de memoria.  Lisis de células del huésped que estén alteradas o dañadas cuando expresen moléculas CMH I; producción de citoquinas que regulan negativamente algunas funciones leucocitarias.
<b>Linfocitos B</b> <i>Células B maduras</i>  <i>Células plasmáticas</i>	Cambian las moléculas de unión a membranas para facilitar la presentación de antígenos; células de memoria.  Sintetizan y secretan anticuerpos contra antígenos específicos.

#### 4.4. Factores de defensa solubles

Tanto factores solubles adquiridos como innatos, representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria. En la Tabla 3 se describen las funciones biológicas de los principales componentes solubles involucrados en la defensa de la glándula mamaria.

**Tabla 3.** Funciones biológicas de algunos de los componentes solubles de la glándula mamaria [Sordillo y Streicher, 2002].

Componente soluble	Función biológica
<b>Citoquinas</b>	Factores proinflamatorios e inmunorreguladores
<b>Complemento</b>	Lisis bacteriana y/o facilitador de la fagocitosis.
<b>Lisozima</b>	Cliva uniones de carbono; desestabiliza la pared celular bacteriana.
<b>Lactoferrina</b>	Secuestra hierro previniendo el crecimiento bacteriano; desestabiliza la pared celular bacteriana; regula la actividad de los leucocitos mamaros.
<b>Anticuerpos</b>	
IgG <sub>1</sub>	Transporte selectivo a la glándula mamaria; opsoniza bacterias para aumentar la fagocitosis, particularmente por macrófagos.
IgG <sub>2</sub>	Transporte a la glándula mamaria durante la diapédesis de los neutrófilos; opsoniza bacterias para aumentar la fagocitosis, particularmente por neutrófilos.
IgA	Asociada a la porción grasa de la leche; no une complemento ni opsoniza partículas; puede aglutinar partículas, prevenir la colonización bacteriana y neutralizar toxinas.
IgM	Eficiente en la fijación de complemento, opsoniza, aglutina y neutraliza toxinas; solo opsónica para neutrófilos en presencia de complemento.

La glándula mamaria también contiene componentes bacteriostáticos no específicos que trabajan de forma independiente y en conjunto con las Igs y los factores celulares para proporcionar protección a la glándula mamaria. Estos factores incluyen lactoferrina, complemento, lisozima y lactoperoxidasa. La lactoferrina es una proteína de unión del hierro producida por las células epiteliales y leucocitos y, en presencia de bicarbonato, secuestra iones férricos libres presentes en la leche. La lactoferrina es un agente bacteriostático, por su capacidad para prevenir el crecimiento de bacterias, tales como estafilococos y coliformes, que presentan requerimientos de hierro [Sordillo, 1997].

El complemento es una colección de proteínas presentes en el suero y la leche que puede involucrarse tanto en la inmunidad innata como inmunidad adquirida. Las proteínas que componen el sistema del complemento se sintetizan principalmente en los hepatocitos, pero otras fuentes incluyen monocitos y macrófagos. Las funciones efectoras del complemento incluyen la lisis de las bacterias, la opsonización, y la atracción de los fagocitos al sitio de la activación del complemento.

La lisozima es una proteína bactericida que está presente en la leche cumpliendo sus funciones mediante la escisión de peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram-positivas, así como de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La lisozima puede potenciar la unión de la lactoferrina a las paredes celulares bacterianas.

La enzima lactoperoxidasa, en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno, es bacteriostático para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Es la enzima más abundante en la leche, que constituye 0,5% de las proteínas del suero total. [Fox y Kelly, 2006; Korhonen y Pihlanto, 2007] y concentraciones casi similares está presente en el calostro. [Korhonen y Pihlanto, 2007]

La enzima mieloperoxidasa producida por los neutrófilos cataliza la misma reacción de la peroxidasa como lactoperoxidasa y además, cataliza la oxidación de cloruro, producto del cual proporciona la actividad bactericida de este sistema.

Numerosos informes han demostrado las capacidades inmunomoduladoras de citoquinas mamarias en importantes funciones de los leucocitos. Los principales grupos de citocinas estudiadas hasta la fecha incluyen interleucinas (IL), factores estimulantes de colonias (CSF), interferones (IFN), y factores de necrosis tumoral (TNF) [Sordillo y Steincher, 2002]

### 4.5. Perspectivas futuras

Según Alnakip y col., (2014) en los últimos años, ha habido una expansión considerable en el conocimiento relacionado con la defensa inmune del huésped contra las infecciones bacterianas de la glándula mamaria. Estas defensas implican mecanismos sofisticados para la detección de diversas bacterias invasoras y la lucha contra ellas a través de respuestas inmunes, innatas y adquiridas. Para mejorar la resistencia animal contra las IIM, las investigaciones sobre inmunología de la glándula mamaria deberían centrarse en lo siguiente:

- La mejora de las funciones inmunitarias o al menos el mantenimiento de estas funciones en los niveles normales, especialmente durante períodos de inmunosupresión.
- Aclarar las funciones de las células mamarias inmunes, principalmente los linfocitos, y en particular las funciones de las células NK y células  $\gamma$   $\delta$ , que no están totalmente definidas.
- Llevar a cabo investigaciones *in vivo* e *in vitro* de respuestas inmunes de la glándula mamaria contra ciertas bacterias comunes en bovinos, incluyendo *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, coliformes distintas de *E. coli*, y *Staphylococcus coagulasa* negativos ya que la mayoría de los estudios se han centrado en *S. aureus* y *E. coli*.
- Aclarar los papeles de cierta quimiocinas y citoquinas.

## 5. MASTITIS BOVINA

### 5.1. Definición

El término mastitis deriva de las palabras griegas *mastos* (mama) e *itis* (inflamación). La mastitis bovina es la reacción inflamatoria de la ubre de la vaca, comúnmente resultante de una infección bacteriana. Es una enfermedad multifactorial y generalmente se da como respuesta a un daño en un tejido u órgano [Ma y col., 1999].

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria, una respuesta de un tejido u órgano a un daño. El propósito de la respuesta inflamatoria es de destruir o neutralizar a los agentes infecciosos y a sus toxinas [National Mastitis Council, 2012].

El principal efecto de la mastitis es la reducción en la cantidad y calidad de la leche producida por la glándula mamaria, lo cual finalmente afecta la rentabilidad de la materia prima. [National Mastitis Council, 2012]

### 5.2. Tipos de mastitis

En los tambos la mastitis generalmente es causada por microorganismos, principalmente bacterias, que invaden la ubre, se multiplican y sintetizan toxinas que causan el daño. Según el National Mastitis Council (2003), dependiendo del grado de inflamación y daño causado, la mastitis se puede clasificar en:

**Mastitis subclínica:** no se detectan cambios en la ubre y no se observan anomalías en la leche. Sin embargo, pueden aislarse microorganismos de la leche y detectarse un aumento en el RCS. En la mayoría de los tambos, este tipo de mastitis es la prevalente y causa las mayores pérdidas económicas por una reducción en la producción de leche. Además, esta infección asintomática constituye un reservorio importante de microorganismos que pueden infectar a otros animales.

**Mastitis clínica subaguda:** esta forma de mastitis puede variar en severidad, dependiendo en parte, del tipo de microorganismo que produjo la infección. Se pueden observar alteraciones en la leche como coágulos y apariencia acuosa. Síntomas como calor, hinchazón y sensibilidad en la ubre pueden presentarse en forma leve o estar ausentes.

**Mastitis clínica aguda:** se caracteriza por un avance repentino de la enfermedad con enrojecimiento, hinchazón, calentamiento y dolor de la ubre, anomalías importantes

en la leche (sangre, coágulos, apariencia acuosa) y reducción en la producción de la misma. Se pueden presentar algunos síntomas sistémicos como fiebre, pérdida del apetito, reducción en la función del rumen, pulso rápido, deshidratación, debilidad y depresión.

***Mastitis crónica:*** es la infección de la ubre que se presenta por un tiempo prolongado. La mastitis crónica puede presentarse como una fase subclínica indefinida, o la infección puede alternar entre fases clínicas y subclínicas. En algunos casos los signos clínicos pueden permanecer por largos períodos.

***Mastitis no bacteriana:*** en esta forma de inflamación de la ubre no es posible aislar microorganismos en muestras de leche. Puede presentarse como casos clínicos o subclínicos.

### 5.3. Susceptibilidad a la mastitis

La incidencia de la mastitis aumenta cuando los mecanismos de defensa de la glándula mamaria se ven alterados. El ganado lechero está expuesto a numerosos factores genéticos, fisiológicos y ambientales que ponen en peligro la integridad e inmunidad de la vaca. El énfasis en la selección genética para maximizar la producción de leche ha aumentado las tensiones metabólicas asociadas con la síntesis y la secreción de leche, lo que generó una correlación negativa entre la capacidad de producción de leche y la resistencia a la mastitis [Sordillo y Streicher, 2002; Sordillo, 2005].

La utilización de máquinas de ordeño puede causar trauma en los tejidos, facilitando la colonización de la punta del pezón por organismos causantes de mastitis. Además, el confinamiento de los animales, el aumento de la densidad de la vaca por unidad de área, y el uso de materiales que apoyan el crecimiento bacteriano también puede tener un impacto marcado en la susceptibilidad de ganado lechero a la mastitis. Sin embargo, uno de los factores de mayor influencia en las capacidades de defensa de la glándula mamaria es la etapa de lactancia [Sordillo, 2005]. Las vacas lecheras son especialmente susceptibles a la mastitis durante el período de periparto debido a la disminución de los mecanismos de defensa de la glándula mamaria [Sordillo, 2005].

### 5.4. Impacto económico de la mastitis bovina sobre la producción lechera.

La mastitis bovina es la enfermedad más devastadora en términos de pérdidas económicas que se producen en los tambos de todo el mundo [Pellegrino y col., 2010]. Un establecimiento lechero sin un programa de control eficaz de la mastitis puede ser testigo

de un porcentaje de infección de hasta un 40%, con un promedio de dos cuartos de la glándula mamaria infectada [Dairy Australia, 2011]. Se considera que la mastitis representa el 70% de los gastos veterinarios totales, resultando en una pérdida de billones de dólares cada año [Bedolla y Ponce de León, 2008].

Tiwari (2013) menciona que los gastos por mastitis bovina sólo en Estados Unidos superan los 1700 millones de dólares por año, con un promedio de 185 dólares por vaca en un año. Además, indica un gasto por mastitis de 1150 millones de dólares por año en India, más de 130 millones de dólares se pierde por la industria lechera de Australia y 140 millones de dólares en Nueva Zelanda. Por otra parte, los gastos por vacas con infecciones intramamarias de países en desarrollo como Brasil son de 92 a 142 dólares por año. En Argentina, diferentes estudios confirman grandes pérdidas económicas como consecuencia de la disminución en la capacidad potencial de producción, gastos de control y tratamiento y reducción del valor biológico del producto en al menos un 7%, lo que representa más de 150 millones de dólares por año [Pellegrino, 2011].

Enormes pérdidas económicas son también consideradas debido a la leche no comercializable o de los productos lácteos contaminados con residuos de antibióticos procedentes del tratamiento, así como por el uso de antibióticos como promotores del crecimiento particularmente en corrales de engorde lácteos en el mundo desarrollado. El uso prolongado de antibióticos en el tratamiento de la mastitis ha llevado a la aparición de cepas resistentes, por lo que hay una constante preocupación por la entrada de estas cepas a la cadena alimentaria [White y col., 2001; Collins y col., 2010].

### **5.5. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica.**

La importancia de los principales patógenos causantes de mastitis ha cambiado con el tiempo, lo que varía no sólo entre países sino también entre las formas de mastitis, probablemente debido a los cambios notables en la industria láctea. La mastitis subclínica es más frecuente que la clínica. Aunque no se manifiesta con cambios visibles en las glándulas mamarias, en la leche aumenta el número de células somáticas. Por lo tanto, no es detectada fácilmente por los agricultores y puede conducir a grandes pérdidas de producción [Hogeveen y col., 2011]. Por otra parte, vacas con infecciones subclínicas deben ser consideradas como una fuente de nuevas infecciones en los tambos. La mastitis subclínica sigue siendo un problema importante en los establecimientos lecheros en Argentina. [Calvinho y Tirante, 2005; Dieser y col., 2013].

En un trabajo realizado por Dieser y col., (2013) se analizaron muestras de leche de un total de 2228 vacas Holando-Argentino (Holstein) de Córdoba, Argentina. El porcentaje

de vacas (1201/2228) que tuvieron mastitis subclínica (RCS  $\geq 200,000$  / ml) fue 53,9%. Este resultado fue similar a los reportados en Corea [Nam y col., 2010] que fue de 54,3%.

En diversos países, existen estudios que determinan la prevalencia de la mastitis subclínica [Haltia y col., 2006; Kalmus y col., 2011; Abera y col., 2012.; Saidi y col., 2013] pero la selección de la muestra de leche (cuarto o compuesto), el método de determinación del RCS y el umbral de RCS han variado entre los estudios, lo que hace difícil las comparaciones.

Los agentes de mastitis subclínica han sido clasificados como patógenos menores y mayores de acuerdo con el grado de inflamación que producen en la glándula mamaria. El trabajo realizado por Dieser y col., (2013), muestra que la prevalencia de los patógenos mayores (*S. aureus*, *S. disgalactiae*, *Corynebacterium spp* y *S. agalactiae*) fue ligeramente inferior a los patógenos menores (SCN) con un 42,7% y 57,3%, respectivamente. Entre los principales patógenos aislados, *S. aureus* fue el agente predominante. En este estudio, los *Staphylococcus* coagulasa negativos representaron el grupo bacteriano más prevalente entre los patógenos menores aislados de infecciones subclínicas. La importancia de este grupo de microorganismos se ha incrementado y se han convertido en el grupo más frecuentemente aislado en leche bovina en varios países.

Aunque la mastitis subclínica no tiene ningún costo directo, la ubre infectada produce un 5% menos de leche por cada 100.000 células somáticas adicionales por ml de leche. El costo atribuible a las formas subclínicas de mastitis asciende a la mayoría del costo total, que se ubica entre 100 y 150 dólares vaca/año o del 50 % al 80% de las pérdidas de producción total de la industria [Bedolla y Ponce de León, 2008].

### **5.6. Microorganismos causales de la mastitis bovina.**

La mastitis es causada por diferentes tipos de bacterias que invaden la ubre mediante el acceso a través del canal del pezón. Una vez dentro de la glándula, estos microorganismos se multiplican y producen sustancias nocivas que causan inflamación y una reducción en la producción y calidad de la leche. Los microorganismos que más frecuentemente causan mastitis se pueden dividir en dos grandes categorías: los patógenos contagiosos y patógenos ambientales [National Mastitis Council, 2011].

#### **5.6.1. Patógenos contagiosos**

En un tambo, la glándula mamaria de una vaca infectada es la principal fuente de patógenos contagiosos. La transmisión de patógenos contagiosos hacia cuartos no infectados ocurre principalmente durante el proceso de ordeño. La leche de cuartos

infectados puede contaminar las unidades de ordeño, manos de los ordeñadores y toallas, que luego actúan como reservorios de infección. [National Mastitis Council, 2011]

Los principales patógenos contagiosos son *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Estas bacterias pueden ser controladas efectivamente mediante procedimientos que previenen la diseminación de bacterias al momento del ordeño, incluyendo buena higiene de la ubre, procedimientos de ordeño apropiados, y desinfección del pezón post ordeño. El uso de terapia en la vaca seca puede ayudar a eliminar infecciones existentes y prevenir nuevas infecciones durante el principio del período seco.

Los *mycoplasmas* son otros patógenos contagiosos importantes. La mastitis causada por *mycoplasmas* puede ser introducida en el rebaño mediante la compra de animales infectados y se disemina durante el ordeño. No hay tratamiento efectivo para la mastitis causada por *mycoplasmas*, pero la enfermedad se puede controlar mediante la identificación de animales infectados seguida por la segregación o descarte de los mismos. [Sudhan y Sharma, 2010; National Mastitis Council, 2011.]

### 5.6.2. Patógenos ambientales

La fuente primaria de patógenos ambientales es el ambiente de la vaca (estiércol, material de cama, material vegetal, tierra, y agua contaminada).

La exposición de la glándula mamaria a los patógenos ambientales ocurre principalmente entre ordeños. Los patógenos ambientales más frecuentemente encontrados corresponden a especies de *Streptococcus spp.* y bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*

Los patógenos ambientales no pueden ser eliminados completamente del ambiente de la vacas pero es posible mantenerlos en niveles bajos si el ambiente está limpio y seco. Por lo tanto, las medidas de control deben estar enfocadas a limitar la exposición de pezones a los microorganismos ambientales. Mantener las ubres limpias y secas en todo momento ayuda al control de la mastitis ambiental. La terapia al secado ayuda a controlar nuevas infecciones por estreptococos ambientales en el período seco. [Sudhan y Sharma, 2010; National Mastitis Council, 2011].

### 5.6.3. Otros patógenos

Varios tipos de bacterias comúnmente encontradas en la ubre pueden causar una irritación, y distintas formas de mastitis.

Los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) se encuentran normalmente colonizando la piel sana de los pezones y en las manos de los ordeñadores, y por esto se

encuentran en una posición “oportunista” para colonizar el canal del pezón. En la actualidad, los SCN son la principal causa de mastitis subclínica en la mayoría de los rodeos lecheros con un adecuado manejo higiénico-sanitario que han controlado la mastitis contagiosa. [Bonetto, 2013].

*Arcanobacterium pyogenes* a menudo causa una forma aguda y purulenta de mastitis. El pronóstico no es favorable una vez que se establece la infección y se suele perder la función del cuarto afectado. Estas infecciones ocurren con mayor frecuencia en vacas secas o vaquillonas antes del parto. La mastitis causada por *A. pyogenes* es más común en climas húmedos [National Mastitis Council, 2003].

*Serratia spp.* son bacterias Gram (-), similar en estructura a *Escherichia coli* y especies de *Klebsiella*. La especie más común que causa mastitis es *Serratia marcescens*. Sin embargo, el tratamiento y control de estos microorganismos es similar en todas las especies de *Serratia* [National Mastitis Council, 2011].

Los microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium* son bacilos Gram (+), anaerobios facultativos o aerobios, de forma irregular, no formadores de esporas *Corynebacterium bovis* lipófilo es la especie más frecuentemente aislada en la leche de vacas con infecciones intramamarias. Cuatro especies de *Corynebacterium* no lipófilos también se han aislado de vacas con mastitis clínica y subclínica: *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, y *Corynebacterium ulcerans*. *C. bovis* se puede encontrar en la leche de las glándulas mamarias. Se considera un patógeno altamente contagioso que puede causar IIM con un ligero aumento en el recuento de células somáticas y una pequeña disminución en la producción de leche en las vacas afectadas [National Mastitis Council, 2004].

*Pasteurella spp* podría ser transportada desde el tracto respiratorio de las vacas a la ubre a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático y causar infecciones intramamarias en condiciones adecuadas. Sin embargo, rara vez se informó como causa de mastitis bovina, aunque pueden producir brotes en rebaños individuales y causar mastitis aguda. Los cuartos afectados pueden producir una secreción amarilla, cremosa, espesa y viscosa, a veces con un olor fétido. [National Mastitis Council, 2001].

*Bacillus cereus* puede causar mastitis gangrenosa aguda y hasta fatal. Las esporas son resistentes a los desinfectantes y al calor. [National Mastitis Council, 1999].

Las principales fuentes de especies de *Mycobacterium* son suelo, el agua, el tracto gastrointestinal de los animales. En general, estas bacterias se introducen en la ubre a través de dispositivos de tratamientos contaminados como agujas. Una vez en las lesiones, son transportados a la ubre a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. [National Mastitis Council, 2001]

## 6. *Staphylococcus aureus*

### 6.1. Características generales

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo perteneciente a la familia *Staphylococaceae* [Todar, 2009]. Son cocos Gram (+), dispuestos en racimos, anaerobios facultativos, no móviles, no esporulados, catalasa y coagulasa positivos, tolerantes a altas concentraciones de cloruro (hasta 15 %) y poseen una temperatura óptima de crecimiento entre 35-37°C. Dentro de los principales factores de virulencia se destacan la cápsula de naturaleza polisacárida, la proteína A y las proteínas extracelulares [Seki y col., 1987], que se pueden clasificar en:

**Tóxicos:** hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ), leucocidinas, toxina exfoliativa (ETA-ETB), toxina de shock tóxico (TST) y enterotoxinas.

**No tóxicos:** catalasa, coagulasa, estafiloquinasa, DNAsa y lipasa. [Pellegrino y col, 2010]

### 6.2. Patogenia

*S. aureus* es generalmente considerado como la causa principal de mastitis contagiosa en el ganado lechero [Pellegrino y col., 2010]. El impacto económico de *S. aureus* suele manifestarse a través del aumento del RCS y la disminución en la producción de leche. Sin embargo, existen diferencias regionales y del tambo en el impacto de las IIM producidas por *S. aureus*. [National Mastitis Council, 2003]

La infección intramamaria se produce cuando el microorganismo ingresa por el orificio del pezón, invadiendo la glándula mamaria. La condición de la piel del pezón y el daño a la queratina del canal del pezón puede afectar la probabilidad de IIM, siendo más propensos a desarrollar infección los pezones agrietados o heridos. Una vez en la glándula mamaria, *S. aureus* se adhiere a las células epiteliales mamarias, disminuyendo la probabilidad de que la bacteria se elimine de la glándula por el ordeño. La principal defensa contra este microorganismo es la fagocitosis mediada por los neutrófilos. Sin embargo, la función fagocítica de los neutrófilos se ve disminuida en la leche, y a su vez, el microorganismo produce un número de factores antifagocitarios, tales como la proteína A, cápsula y pseudocápsula, que disminuyen la probabilidad de ser fagocitado por los neutrófilos. Además, las concentraciones de anticuerpos opsonizantes y factores del

complemento, que facilitan la captación de *S. aureus* por los neutrófilos, son bajos en la leche impidiendo aún más la eliminación de la bacteria. [Pellegrino y col., 2010].

Una vez establecido en la glándula, la IIM puede conducir a ulceración y erosión del seno y conductos lactífero, el ingreso de células inflamatorias al tejido del parénquima, y en última instancia el daño de las células epiteliales secretoras. [Sutra y Poutrel, 1994]. El daño tisular en la glándula mamaria se complica aún más por las toxinas y enzimas extracelulares producidas por *S. aureus* [Sutra y Poutrel, 1994].

Algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se resuelve. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de la leche retorna a la normalidad en pocos días. Cuando la infección persiste, los conductos se mantienen tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras pasen a una etapa de descanso (sin producir) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño [Nickerson y Helad, 1981]. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo ocurriendo posteriormente la cicatrización.

## 7. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN

El concepto principal de un plan de control contra la mastitis, es que la infección puede ser controlada ya sea, reduciendo la posibilidad de que los patógenos lleguen a entrar por el esfínter del pezón o aumentando el poder de resistencia contra infecciones de cada vaca [Smith y Hogan, 1997]. En la actualidad, el control de la mastitis se basa en la adopción de estrategias preventivas, las que incluyen una buena higiene en el ordeño, un funcionamiento adecuado del equipo de ordeño, áreas de alojamiento secas y limpias, una nutrición balanceada, y una identificación y tratamiento adecuado de mastitis clínica y subclínica [McDougall y col., 2009]. El control de la mastitis en tambos se ha basado principalmente en la reducción de patógenos contagiosos de mastitis a través del uso del “plan de cinco puntos”, que tiene como objetivo reducir el grado y la duración de la infección [National Mastitis Council, 2003].

El plan incluye:

### **1) Utilización de medidas que mejoren la rutina de ordeño como:**

*Correcto uso del equipo de ordeño y su evaluación periódica.*

*Limpieza y secado de los pezones antes del ordeño.*

*Desinfección de los pezones pre y posordeño (pre-dipping y teat-dipping).*

*Lavado y desinfección de las pezoneras y de la línea de producción antes y después del ordeño.*

### **2) Aplicación del plan de vacunación.**

### **3) Tratamiento antibiótico de los cuartos al momento del secado.**

**4) Tratamiento rápido de los casos de mastitis clínicas**, a través del diagnóstico precoz.

### **5) Eliminación de vacas con mastitis crónicas.**

Con este tipo de medidas se ha logrado disminuir y, en algunos tambos hasta eliminar, las mastitis causadas por *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae*. Sin embargo, las infecciones producidas por el *S. aureus* (entre un 15% a un 30% de las infecciones), no han podido ser controladas. Si bien el tratamiento con antibióticos al secado ha demostrado eliminar hasta el 80% de las infecciones presentes y hasta el 80% de nuevas infecciones causadas por diferentes patógenos durante el período seco, este tratamiento no es del todo efectivo en animales infectados por *S. aureus*, donde menos de un 15% de los bovinos responde a la terapia con antibióticos. Esto se debe a la mala penetración de la droga en la glándula mamaria, lo cual ocasiona que un porcentaje importante de bacterias sobreviva en las células huésped y produzca infecciones recurrentes post tratamiento [Craven y Anderson, 1984; Yancey y col., 1991].

La terapia con antibióticos se basa principalmente en el uso de antibióticos del tipo  $\beta$ -lactámicos, como la penicilina, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas y cefalosporinas [Gentilini y col., 2000]. Aun cuando los antibióticos han tenido un gran impacto en la salud de las vacas lecheras y por consiguiente en la producción de leche, se cuestiona su uso, debido a la posibilidad de producir reacciones anafilácticas en los consumidores debido a la presencia de restos de antimicrobianos en la leche de consumo humano [Errecalde, 2004]. También existe una enorme preocupación por el uso indiscriminado de antibióticos debido a que contribuyen al creciente aumento de resistencia a algunos antibióticos que han presentado patógenos causantes de enfermedades en el ser humano. Esto ha llevado a que numerosas investigaciones apunten a encontrar alguna alternativa profiláctica para la prevención de la mastitis bovina, con el afán de disminuir o eliminar el uso de antibióticos, principalmente como método preventivo al secado [Pellegrino, 2011].

## 8. VACUNAS

El desarrollo de vacunas para la protección de las nuevas infecciones por *S. aureus* es de gran interés para la industria de la producción de leche. Se han probado diferentes vacunas obteniendo resultados variados, dependiendo del tipo de vacuna, adyuvantes y otros factores [Watson y Lee, 1978; Kennedy y col., 1981; Watson, 1992; Sordelli y col.,

1993; Watson y Davies, 1993; Hoedemaker y col., 2001; Gomez y col., 2002; Pellegrino y col., 2008]

Aunque las vacunas contra mastitis causada por *S. aureus* han sido estudiadas durante décadas, existen considerables avances en la producción de diferentes vacunas con el objetivo de lograr mejores resultados. Hace décadas, el objetivo del uso de vacunas fue la reducción en la severidad de la mastitis causada por este agente, aunque la mayoría de las vacunas no fueron eficaces en la protección de las nuevas infecciones [Chang y col., 2008; Middleton, 2008]. Actualmente, con el progreso de nuevas tecnologías, el objetivo principal es la obtención de un mayor grado de protección contra nuevas infecciones. [Pereira, 2011] Se ha logrado un progreso significativo en el desarrollo de vacunas contra algunos microorganismos causantes de mastitis. Quizás las más conocida y ampliamente utilizada es la bacteria mutante contra *E. coli*. Esta vacuna, denominada J5, está disponible en varios países como Estados Unidos, Francia y Dinamarca; mostró reducir la duración y la severidad de los síntomas de la mastitis luego del desafío con una cepa virulenta de *E. coli* [Hogan y col., 1999].

Con respecto a *S. aureus*, existen numerosos estudios que tienen como objetivo estudiar la prevención de mastitis bovina frente a este microorganismo, por vacunas basadas en bacterinas de una o más cepas bacterianas, toxoides y diferentes adyuvantes [Yoshida y col., 1984; Nickerson y col., 1993; Nordhaug y col., 1994a; Nordhaug y col., 1994b; Watson, 1992; Watson y col., 1996; Calzolari y col., 1997; Derosa y Sordillo, 1997; Giraud y col., 1997; O'Brien y col., 2000, Hoedemaker y col., 2001; Leitner y col., 2003; Hu y col., 2003; Lee y col., 2005; Prenafeta y col., 2010], DNA con proteínas recombinantes [Carter y Kerr, 2003; Shkreta y col., 2004] y únicamente proteínas recombinantes [Chang y col., 2008]. La utilización de vacunas basadas en cepas de *S. aureus* inactivadas [Tenhagen y col., 2001] o vivas avirulentas [Pellegrino y col., 2008; 2010] que representan un gran *pool* de antígenos, parece ser una vía interesante para prevenir las IIM.

Pellegrino en su tesis doctoral (Mastitis bovina: Ensayos experimentales de vacunación en bovinos con la cepa *S. aureus* RC122 para su estudio en la prevención de la enfermedad, 2010) define que las vacunas inactivadas son muy buenas en estimular la respuesta humoral, pero no son, por lo general, muy eficaces en despertar la inmunidad celular. Una vacuna viva avirulenta, donde se ha debilitado al microorganismo patógeno a una forma que no causa enfermedad, pero que todavía puede crecer dentro del animal después de ser aplicado, imita fielmente el desarrollo de una verdadera enfermedad. Las vacunas vivas avirulentas presentan una serie de ventajas:

- Imitan la infección natural.
- Inducen una amplia respuesta inmune, humoral y celular, por la activación de las células B y T así como de las células de memoria.

- Permiten la expresión y presentación de antígenos a largo plazo.
- Permiten la presentación de antígenos en sus formas nativas (como ocurre en forma natural).
- Poseen efecto adyuvante natural.

## 9. *Staphylococcus aureus* RC122

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 [Bogni y col., 1998]. Esta mutante obtenida por mutagénesis con MNNG (N – metil –N- nitro – N - guanidina), fue seleccionada sobre la base de un menor tamaño de colonia y una marcada disminución de la virulencia (1350 veces menor) en un modelo de ratón. Entre las principales características, se observó un crecimiento lento y disminución en la síntesis de varias exotoxinas tales como  $\alpha$  y  $\beta$  hemolisinas, DNAsa y coagulasa con respecto a la cepa parental RC108 [Bogni y col., 1998].

A pesar de su avirulencia, la mutante RC122, fue capaz de multiplicarse en diferentes órganos en un modelo experimental *in vivo* desarrollado en ratón [Bogni y col., 1998]. Asimismo la inoculación de  $10^8$  ufc de la cepa en la glándula mamaria bovina no produjo inflamación ni signos de mastitis clínicas [Reinoso y col., 2002]. Ensayos de protección en ratón mostraron que esta mutante fue capaz de conferir protección frente al desafío con cepas homólogas y heterólogas [Bogni y col., 1998]. Esta característica, sumada a la marcada avirulencia, apuntó a su uso como posible cepa vacunal.

Un ensayo experimental de protección [Pellegrino y col., 2008] evaluó la respuesta de vaquillonas vacunadas con la cepa *S. aureus* RC122 al desafiarlas con la cepa virulenta *S. aureus* RC108 inoculada vía intramamaria. Se determinó signos clínicos, producción de leche, eliminación de bacterias, recuento de células somáticas y título de anticuerpos específico IgG en la sangre y la leche. El ensayo consistió en la inoculación de dos dosis subcutáneas de un cultivo de la cepa mutante a vaquillonas preñadas 30 y 10 días antes del parto. Todos los animales fueron desafiados por vía intramamaria 10 días después del parto con la cepa virulenta parental de *S. aureus* RC108. Los resultados mostraron que si bien, luego del desafío, el RCS y la eliminación de bacterias en leche fue menor para las vacas vacunadas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa cuando se la comparó con las vacas no vacunadas. Con respecto al título de anticuerpos, si bien se observaron diferencias significativas en sangre antes del desafío, en leche sólo se observó una diferencia significativa después del mismo. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la producción de leche entre los grupos.

Sobre los resultados anteriores, se planteó un nuevo esquema de vacunación en un ensayo de protección con el fin de aumentar el título de anticuerpos en leche [Pellegrino y col 2010]. En este ensayo, vaquillonas fueron inoculadas por vía subcutánea (SC) con tres dosis de la vacuna (cepa RC122) 30 días antes de la preñez, 30 días después de la preñez y 10 días antes del parto. Veinte días después del parto se administró una cuarta dosis por vía intramamaria (IM) de la cepa inactivada por formol. Veinte días después de la dosis IM, todos los animales fueron desafiados con la cepa virulenta RC108. Los resultados demostraron un aumento en el nivel de IgG específico en sangre y leche de vaquillonas vacunadas. El principal isotipo del anticuerpo encontrado en la sangre fue IgG<sub>2</sub>. Los sueros de las vaquillonas vacunadas aumentaron la fagocitosis en comparación con los sueros de vaquillonas no vacunadas, permitiendo opsonizar cepas de *S. aureus* heterólogas. Se demostró que la inmunización de vaquillonas con la cepa RC122 fue capaz de producir anticuerpos opsonicos en sangre y leche y proporcionar protección manifestada en una reducción significativa de la eliminación de bacterias después del desafío. Sin embargo, la administración de la dosis IM no produjo un aumento significativo en los niveles de anticuerpos en sangre y leche respecto a los observados por la inoculación SC.

Sobre las bases de estos resultados, se planteó la realización de un ensayo de vacunación a campo y desafío natural, utilizando el esquema de vacunación que incluye 3 dosis SC antes del parto. Algunos de los estudios realizados en este ensayo, son los que forman parte de los objetivos de este trabajo final.

### **Hipótesis general**

La inoculación de la cepa *S. aureus* RC122 en bovinos por vía subcutánea antes del parto, disminuye la severidad de la mastitis y aumenta la protección ante la misma.

### **Hipótesis específicas**

- A.** La inoculación subcutánea de la cepa avirulenta RC122 desencadena la producción de anticuerpos protectores (IgG total) en sangre y leche de animales inoculados.
  
- B.** La inoculación subcutánea de la cepa avirulenta RC122 desencadena la producción de anticuerpos capaces de opsonizar microorganismos patógenos productores de mastitis bovina.
  
- C.** La inoculación con la cepa avirulenta RC122 permite mejorar el estado sanitario en animales vacunados, evidenciado por un aumento en la producción de leche y una disminución en el Recuento Celular Somático y en el aislamiento de microorganismos patógenos.

### Objetivo general

Evaluar la eficacia de la vacunación con la cepa avirulenta *S. aureus* RC122 en un rodeo lechero comercial (de la Cuenca de Villa María).

### Objetivos específicos

- A1.** Determinar si la inoculación subcutánea de la cepa avirulenta RC122 desencadena la producción de anticuerpos protectores (IgG total) en sangre y leche de animales inoculados.
- A2.** Determinar si la inoculación subcutánea de la cepa avirulenta RC122 desencadena la producción de anticuerpos capaces de opsonizar microorganismos patógenos productores de mastitis bovina.
- A3.** Estimar la eficacia de la vacunación a partir de los siguientes parámetros obtenidos en el día 60 post-parto del ensayo de vacunación: a) Producción de leche, b) Incidencia de infecciones, c) Análisis de Recuento Celular Somático (RCS).

## 1. LISTADO GENERAL DE MATERIALES UTILIZADOS

### 1.1. Determinación de la producción de anticuerpos específicos (IgG total) en sangre y leche de animales inoculados.

#### Cepa bacteriana utilizada

- Cepa mutante *S. aureus* RC122

#### Anticuerpos comerciales

- IgG monoclonal, anti-bovino, producida en ratón y conjugada con fosfatasa alcalina (SIGMA, clon BG-18).

#### Medios de cultivos

- Caldo TSB Britania
  - 40 gr de caldo en 1000 ml de agua destilada

#### Soluciones y reactivos para ensayo de ELISA

- *Buffer*  $\text{CO}_3^-$  0,05 M pH9,6
  - 45,3 ml  $\text{NaHCO}_3$  (0,1M)
  - 18,2 ml  $\text{NaCO}_3$  (0,1M)
  - Agua destilada c.s.p. 1000 ml
- Glutaraldehído al 0,025% en *buffer*  $\text{CO}_3^-$  0,05M pH 9,6.
- Solución PBS (1000 ml)
  - 77,4 ml de Solución A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M)
  - 45,2 ml de Solución B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5M)
  - 877,4 ml de agua destilada
- Solución de lavado
  - PBS 0,1M pH 7,4
  - Tween 20 (SIGMA) al 0,05%.
- Solución de bloqueo
  - PBS 0,1M pH 7,4
  - Tween 20 (SIGMA) al 0,5%
  - Leche en polvo (Oxoid) al 2%
- Reactivo revelador (BioRad)
  - 1 ml Diethanolamina *buffer* (5X)
  - 4 ml Agua destilada
  - 1 tableta P-nitrofenilfosfato
- Solución stop
  - NaCl 0,4 N en agua destilada.

### Materiales y equipos

- Sonificador Vibra-cell ultrasonic processors Model VC1000.
- Lavador de ELISA WeWash 4 (Denley)
- Pipeta automática de 100  $\mu$ l
- Policubetas NUNCLON Delta (Nunc) de 96 wells

### 1.2. Determinación de la capacidad opsonica de sueros de vacas y vaquillonas vacunadas con la mutante *S. aureus* RC122.

#### Cepas bacterianas utilizadas

- Cepa mutante *S. aureus* RC122
- Cepa parental *S. aureus* RC108
- *Escherichia coli* aislada de alimentos bovinos
- *Staphylococcus haemolyticus* (SCN)
- *Staphylococcus chromogenes* (SCN)
- *Streptococcus uberis*

#### Medio de cultivo

- Caldo BHI Britania
  - 37 gr en 1000 ml de agua destilada.
- Caldo MRS Britania
  - 50 gr en 1000 ml de agua destilada

#### Soluciones

- Solución stock del colorante
  - 0,1 mg FITC (SIGMA) en 1ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1M, pH 9.
- Solución de lisado pH 7,2 fría.
  - 40 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15M
  - 9 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,15M
  - Agua destilada c.s.p 1000 ml
- Solución de restauración pH 7,2
  - 40 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15M
  - 9 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,15M
  - 27 gr NaCl
  - Agua destilada c.s.p 1000ml
- Solución PBS (1000 ml)
  - 77,4 ml de Solución A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1M)

- 45,2 ml de Solución B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5M)
- 877,4 ml de agua destilada
  
- Solución de Turk
  - Ácido acético al 5% en agua destilada
  - Azul de metileno al 1%
  
- Solución de azul de tripan
  - Azul tripan 0,2% P/V en agua destilada, 4 partes del colorante con una parte de NaCl 4,5%
  
- Solución de stop de fagocitosis bien fría
  - NaCl 0,85%-EDTA 0,04%
  - Bromuro de Etidio (0,5  $\mu\text{l}$  de Bromuro de Etidio en 100  $\mu\text{l}$  de mezcla de fagocitosis)

### **Materiales y equipos**

- Cámara de Neubauer
- Microscopio óptico (100X) de fluorescencia
- Pipetas automáticas

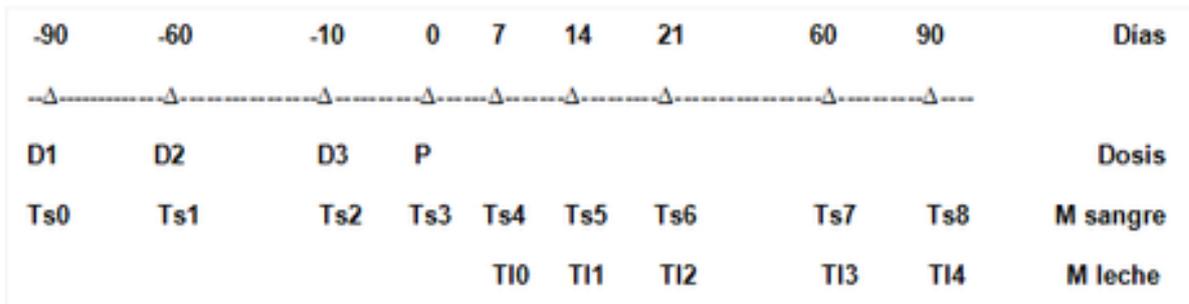
### **Pools de sueros de sangre**

- *Pools* de sueros de sangre extraídos de animales pertenecientes al GV y GNV correspondientes a todos los tiempos de muestreo.

## **2. ESQUEMA DE VACUNACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS**

Todos los ensayos se realizaron a partir de muestras de suero de sangre y leche obtenidas del ensayo de vacunación llevado a cabo por Richardet y col., (2013) en su trabajo de tesis. Del mismo, se obtuvieron las muestras y se procesaron como se describe a continuación.

El ensayo de vacunación consta de la inoculación con tres dosis subcutáneas (D1, D2, D3), nueve tiempos de muestreo para sangre y cinco para leche. A continuación, en la Figura 6 se describe el esquema de vacunación utilizado.



D1: Primera dosis de vacuna, 90 días pre-parto D2: Segunda dosis de vacuna, 60 días pre-parto. D3: Tercera dosis de vacuna, 10 días antes del parto. P: Parto.

Muestras de sangre: Ts 0: antes de D1. Ts 1: antes de D2. Ts 2: antes de D3. Ts3: antes del parto. Ts 4-Ts8: 7, 14, 21, 60, 90 días después del parto.

Muestras de leche: TI 0 - TI 4: 7, 14, 21, 60, 90 días post parto.

**Figura 6.** Esquema de vacunación y toma de muestras de vacas inmunizadas con la cepa *S. aureus* RC122 para la realización del ensayo de vacunación e infección natural. D1 y D2: primera y segunda dosis de vacuna por vía SC. P: parto. Ts0-Ts8: muestras de sangre. TI0-TI8: muestras de leche.

### 3. ACTIVACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA PRELIMINAR DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RC122 Y RC108

A partir de caldos congelados de las cepas RC122 y RC108 se sembraron 10 ul del mismo, con ansa calibrada para tal fin, en agar TSA conteniendo sangre de carnero al 5%. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h - 48 h y se registró la morfología de la colonia, el patrón hemolítico ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) y la producción de pigmento. Las colonias crecidas fueron transferidas con ansa a una placa conteniendo TSA, a partir de la cual se les realizó la tinción de Gram. A los microorganismos con morfología de cocos y tinción de Gram (+), se les realizó la prueba de la catalasa para diferenciarlos en *Streptococcus spp.* y *Staphylococcus spp.* A los catalasa (+) se les realizó la prueba de la coagulasa.

Las pruebas para la identificación de familia se detallan a continuación:

**Producción de catalasa:** se tomó una colonia aislada del microorganismo, y se la homogeneizó en una gota de agua oxigenada dispuesta sobre un portaobjeto. El peróxido de hidrógeno, por acción de la enzima catalasa, se desdobra en oxígeno y agua. La reacción es positiva cuando se observa la formación de burbujas.

**Producción de hemolisinas:** la producción de  $\alpha$  y  $\beta$  hemolisinas se evidenció en placas de agar TSA conteniendo sangre de carnero al 5% como un halo transparente ( $\alpha$ ) o translúcido verdoso ( $\beta$ ) luego de 24 h de incubación a 37°C y transparente luego de 12 h - 24 h a 4°C.

**Producción de coagulasa:** se inocularon 5 ml de caldo BHI, y se lo incubó durante 18 h a 37 °C con agitación para obtener microorganismos en fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, 300 µl del cultivo se colocaron en un tubo estéril, al cual se le agregaron 300 µl de plasma de conejo. El tubo se incubó en baño de agua a 37 °C, y se observó la formación de coágulo a las 4 h y a las 24 h.

## 4. TOMA DE MUESTRA PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN SANGRE Y LECHE

### 4.1. Toma de muestras de leche para ELISA.

#### Justificación de la técnica

Con el fin de obtener suero a partir de las muestras de leche, se procedió a precipitar la fracción de las caseínas mediante el agregado de ácido acético. Esto produce un descenso del pH de la leche al cual las caseínas dejan de estar en suspensión y precipitan.

Se recolectaron muestras a diferentes tiempos de los 4 cuartos de cada uno de los animales de los GV y GNV, en forma manual con previa higiene del pezón. Se agregó 1 ml de ácido acético puro para precipitar la caseína y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min. Posteriormente, las muestras de suero de leche fueron fraccionadas en tubos Eppendorff y se conservaron a -20 °C hasta su utilización para la detección de anticuerpos por la técnica de ELISA.

### 4.2. Toma de muestras de sangre para ELISA.

A cada uno de los animales de los grupos GV y GNV se les extrajo sangre por punción de la vena de la cola (20 ml aproximadamente) a diferentes tiempos. Las muestras se colocaron en tubos secos y estériles y se dejaron en estufa a 37 °C para facilitar la retracción del coágulo. Posteriormente, se clarificó el suero por centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, se fraccionó en tubos Eppendorff estériles y se conservó a -20 °C hasta su utilización para la detección de anticuerpos por la técnica de ELISA.

## 5. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN SANGRE Y LECHE

### Titulación de los anticuerpos.

Previo a realizar la técnica de ELISA para la determinación de anticuerpos específicos, se titularon los anticuerpos en las muestras de sangre y leche de los animales de los GV y GNV para determinar la mejor dilución de trabajo. Para ello se realizó la técnica de ELISA probando diluciones seriadas de las muestras (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560) en combinación con diferentes diluciones (1/500, 1/2500, 1/5000, 1/10000, 1/15000) del anticuerpo monoclonal IgG total.

Se determinó que las diluciones adecuadas de trabajo serían 1/80 y 1/10 para sangre y leche, respectivamente. Por otro lado, se observó que la dilución de IgG total a utilizar sería 1/5000 para sangre y 1/2500 para leche.

La detección de anticuerpos específicos en muestras de sangre y leche se realizó por la técnica de ELISA, siguiendo la metodología descrita por Pellegrino y col., (2010), con las modificaciones que se detallan a continuación:

### 5.1. Preparación del antígeno

Un cultivo de 100 ml de la cepa mutante RC122 crecida en caldo TSB durante 18 h a 37 °C con agitación, fue fraccionado en 10 tubos y centrifugado a 5000 rpm durante 5 min. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de *buffer* CO<sub>3</sub><sup>=</sup> 0,05 M pH 9,6 (NaHCO<sub>3</sub> (0,1M) 45,3 ml, NaCO<sub>3</sub> (0,1M) 18,2 ml, agua destilada c.s.p. 1000 ml) y sonicadas con un sonicador (Vibra-cell ultrasonic processors Model VC1000) durante 15 min a una amplitud de 70 Amp.

Los tubos sonicados se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* resuspendido en 10 ml de *buffer* CO<sub>3</sub><sup>=</sup>. Los tubos se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

### 5.2. Sensibilización de la policubeta

#### Justificación de la técnica

El pre-tratamiento de la policubeta con una solución de glutaraldehído, es imprescindible cuando se utilizan células enteras, ya que este actúa como fijador, permitiendo una mejor adhesión de las células al soporte plástico.

Previo a la sensibilización de la policubeta con la suspensión de células, se las trató con 100 µl de solución de glutaraldehído al 0,025% en *buffer* CO<sub>3</sub><sup>=</sup> 0,05 M pH 9,6.

Se incubó durante 1 h a 37 °C y se realizaron tres lavados con solución de lavado (PBS 0,1M pH 7,4, Tween 20 (SIGMA) al 0,05%). Todos los pocillos de la policubeta fueron sensibilizados con 100 µl de la suspensión de células sonicadas. La policubeta, envuelta en nylon, fue incubada durante 2 h a 37 °C y posteriormente toda la noche a 4 °C. Luego de la incubación, la policubeta fue lavada tres veces con solución de lavado.

### 5.3. Bloqueo de la policubeta

Se colocaron en cada pocillo 100 µl de solución de bloqueo (PBS 0,1M pH 7,4, Tween 20 (SIGMA) al 0,5%, leche en polvo (Oxoid) al 2%) y se incubó durante 2 h a 37 °C. Se lavó tres veces con solución de lavado.

### 5.4. Cuantificación de los anticuerpos

Luego del bloqueo se agregaron 100 µl de una dilución 1:80 de suero de sangre o de 1:10 de suero de leche. La policubeta se incubó durante 2 h a 37 °C y se lavó tres veces con solución de lavado. Para la determinación de IgG total, se agregaron 100 µl de una dilución 1/5000 o 1/2500 de IgG monoclonal conjugada con fosfatasa alcalina, para suero de sangre o de leche, respectivamente. La placa se incubó durante 2 h a 37 °C y se lavó tres veces con solución de lavado.

Posteriormente, para realizar la determinación, se agregaron 100 µl del reactivo revelador (BioRad) (diethanolamina *buffer* (5X) 1ml, agua destilada 4 ml, p-nitrofenilfosfato 1 tableta) y se incubaron 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Para frenar la reacción enzimática se agregaron 100 µl de solución stop (NaCl 0,4N en agua destilada). La lectura se realizó a una DO de 405 nm en un lector para placas de ELISA (Lab system Multiscan MS).

## 6. ENSAYO DE FAGOCITOSIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD OPSÓNICA DE SUEROS DE SANGRE

### 6.1. Ensayo de fagocitosis frente a cepas homólogas

#### 6.1.1. Toma de muestras para fagocitosis

Para el ensayo de fagocitosis, las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular (aproximadamente 60 ml) de una vaca sana con serología negativa para *S.aureus*, se colocaron en frascos estériles conteniendo 6,6 ml del anticoagulante ACD (citratato trisódico 8,8 g, ácido cítrico 3,2 g, dextrosa 10 g, agua desionizada c.s.p 200 ml), se agitaron suavemente para evitar la coagulación y se llevaron inmediatamente al laboratorio para el aislamiento de los neutrófilos.

#### 6.1.2. Marcado de *S. aureus* RC122 y *S. aureus* RC108 con FITC

##### **Justificación de la técnica**

El isotiocianato de fluoresceína isómero I (FITC), es un fluorocromo que se une inespecíficamente a proteínas. Esto permite que las bacterias, que poseen proteínas en sus estructuras externas, se observen de color verde bajo un microscopio de fluorescencia.

Un cultivo de la cepa RC122 y otro de la cepa parental RC108, ambos crecidos en 10 ml de caldo BHI durante 18 h - 24 h con agitación, se fraccionaron 1 ml en tubos eppendorf. Los tubos se centrifugaron durante 3 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, se descartaron los sobrenadantes, los *pellet* se resuspendieron en 1 ml de FITC/NaHCO<sub>3</sub> 0,1mg/ml (FITC (SIGMA) en NaHCO<sub>3</sub> 0,1M, pH 9 y se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados con NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9 para eliminar el FITC no adherido. Se conservó a 4 °C, no más de 48 h, hasta su utilización.

#### 6.1.3. Recuento en placa en superficie, para determinar concentración de microorganismos

Luego de añadir 15 a 20 ml de medio TSA en placas de Petri estériles y secar las placas abiertas en una estufa como mínimo durante 15 minutos, se depositaron 100 µl de

cada una de las diluciones previamente realizadas con las cepas de *S. aureus* RC122 y RC108 y en la superficie del agar de cada una de las placas por duplicado. Rápidamente, se extendió la alícuota de 100  $\mu$ l utilizando una espátula de Drigalsky hasta que dicha superficie quede seca. Se incubaron las placas invertidas a 37° C durante 24 h. Se contó el número de colonias en aquellas placas que presenten entre 30 y 300 de las mismas, calculando el número de microorganismos que se marcaron previamente.

### 6.1.4. Aislamiento de neutrófilos bovinos

La sangre obtenida de la vena yugular, según se detalla en el punto 6.1.1, se fraccionó en dos botellas de vidrio y se centrifugó durante 30 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartaron las capas superior e intermedia, que contienen el plasma y los linfocitos. Los glóbulos rojos, presentes en la capa inferior junto a los neutrófilos, se lisaron agregando 60 ml de solución de lisado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15 M 40 ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,15 M 9 ml, agua destilada c.s.p 1000 ml) pH 7,2 fría y se mezclaron por inversión suave durante 1 min. Inmediatamente, se agregaron 30 ml de solución de restauración pH 7,2 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15M 40 ml,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,15 M 9 ml, NaCl 27g, agua destilada c.s.p 1000 ml) y se mezcló nuevamente durante 20 seg. Las botellas se centrifugaron nuevamente durante 20 min a 2000 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, y el *pellet* blanco enriquecido en neutrófilos, se resuspendió con pipeta Pasteur en 1 ml de PBS. De ser necesario, se realizaron pasos de lavado adicionales hasta obtener un *pellet* limpio (blanquecino). Por último, se resuspendieron los neutrófilos en 1 ml de medio esencial mínimo (MEM), y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización (no más de 2 h).

### 6.1.5. Recuento total de neutrófilos

Se mezclaron 50  $\mu$ l de la suspensión de leucocitos con 950  $\mu$ l de la solución de Turk (ácido acético al 5% en agua destilada y azul de metileno al 1% al momento de usar). Un volumen de 0,1  $\text{mm}^3$  se depositó 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:

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

20 = dilución empleada (50  $\mu$ l de suspensión de leucocitos en 1 ml de Turk)

$10^4$  = Volumen de la cámara de Neubauer.

### 6.1.6. Recuento de neutrófilos viables (exclusión de Azul Tripán)

#### Fundamento de la técnica

Los métodos de determinación de viabilidad se basan en el análisis de dos parámetros: actividad metabólica de la célula o integridad de la membrana plasmática.

Los métodos más comunes para evaluar la integridad de la membrana y determinar el N° de células viables, son los denominados tests de exclusión de colorantes vitales (ej.: Azul Tripán). Las células que poseen sus membranas íntegras, excluyen estos colorantes en forma activa. El método de Azul Tripán pone en evidencia el funcionamiento de un mecanismo de transporte activo a través de la membrana plasmática.

Se realizó una dilución 1/10 de la suspensión celular en la solución colorante (azul tripán 0,2% P/V en agua destilada, 4 partes del colorante con una parte de NaCl 4,5% al momento de usar). Un volumen de 0,1 mm<sup>3</sup> se cargó en la cámara de Neubauer, y se contó el número de leucocitos teñidos de azul (no viables) en cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara.

Se determinó el **número de leucocitos no viables/ml** de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

10 = dilución empleada (10 µl de suspensión de leucocitos en 90 µl de Tripán)

10<sup>4</sup> = Volumen de la cámara de Neubauer.

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

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

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

### 6.1.7. Ensayo de fagocitosis

Para determinar la capacidad opsonica de los sueros de sangre obtenidos durante la vacunación, las bacterias previamente marcadas con FITC se homogeneizaron con dichas muestras durante 30 min a 37 °C con movimientos suaves.

Para realizar la mezcla, se utilizaron *pools* de sueros de sangre (diluido 1/80) obtenidos de vacas de los GV y GNV a diferentes tiempos. En las muestras de sangre, la

capacidad opsonica se determinó en las muestras obtenidas en los tiempos D1, D2, y D3. Luego de la incubación, se adicionaron neutrófilos en una relación neutrófilo:bacteria 1:40, y se incubaron durante 30 min a 37 °C con movimientos suaves. La fagocitosis se frenó agregando 500 µl de solución stop (NaCl 0,85%-EDTA 0,04%) bien fría. La fluorescencia extracelular se neutralizó con el agregado de 0,5 µl de bromuro de etidio en 100 µl de mezcla de fagocitosis.

Como controles se utilizaron:

- Bacterias opsonizadas solas (sin neutrófilos)
- Neutrófilos solos (sin bacterias)
- Bacterias sin opsonizar con neutrófilos.

La cuantificación de la fagocitosis se realizó por recuento de células en microscopio óptico (100X) de fluorescencia con aceite de inmersión. Se examinaron al menos 200 células y se determinó el número de bacterias internalizadas en cada una. Se calculó el índice de fagocitosis (IF) de acuerdo a la siguiente fórmula:

**IF** = (% de Neutrofilos conteniendo al menos 1 bacteria) x (promedio del nº de bacterias / Neutrofilo positivo).

### 6.2. Ensayo de fagocitosis frente a cepas heterólogas

Para determinar la capacidad opsonica, frente a cepas heterólogas, de los sueros de sangre obtenidos durante la vacunación, bacterias (cepas de *Escherichia coli* aislada de alimentos, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus chromogenes* y *Streptococcus uberis*, todos productores de mastitis bovina) previamente marcadas con FITC se homogeneizaron con *pools* de sueros de sangre (diluido 1/80) obtenidos de vacas de los GV y GNV. Las mezclas se incubaron durante 30 min a 37°C con movimientos suaves [Pellegrino y col., 2010].

Luego de la incubación, se adicionaron neutrófilos previamente aislados en una relación neutrófilo:bacteria 1:40, y se incubaron durante 30 min a 37 °C con movimientos suaves. La fagocitosis se frenó agregando 500 µl de solución stop (NaCl 0,85%-EDTA 0,04%) bien frío. La fluorescencia extracelular se neutralizó con el agregado de 0,5 µl de bromuro de etidio en 100 µl de mezcla de fagocitosis. Como controles se utilizaron muestras con bacterias opsonizadas solas (sin neutrófilos), neutrófilos solos (sin bacterias) y bacterias no opsonizadas con neutrófilos.

La cuantificación de la fagocitosis se realizó por recuento de células en microscopio óptico de fluorescencia (100X). Se examinaron al menos 200 células y se determinó el

número de bacterias internalizadas en cada una. Finalmente, se calculó el índice de fagocitosis (IF) de acuerdo a la siguiente fórmula:

**IF** = (% de Neutrofilos conteniendo al menos 1 bacteria) x (promedio del n° de bacterias/ Neutrofilo positivo).

## 7. ANÁLISIS DEL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE EN ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS

El análisis del estado sanitario de la ubre se realizó midiendo los siguientes parámetros:

- Producción de leche (en litros)
- Aislamiento de bacterias patógenas en leche
- Recuento celular somático (RCS)

Se utilizaron datos del día 60 post-parto del ensayo de vacunación, obtenidos de un trabajo realizado por Richardet, y col., (2013) donde se realiza un análisis de datos pertenecientes a todos los tiempos de muestreo. Los datos analizados corresponden a los obtenidos de todas las vacas y vaquillonas involucradas en el ensayo de vacunación, pertenecientes a los GV y GNV.

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Para realizar cada análisis de los datos obtenidos y manipulados se utilizó el software estadístico InfoStat.

En los análisis de datos de ELISA, Fagocitosis, RCS y producción de leche, se realizaron comparaciones de cada grupo a través de un análisis de varianzas (ANOVA).

Un p-valor < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

## 1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS (IgG TOTAL) EN SANGRE Y LECHE DE ANIMALES INOCULADOS

Con el objetivo de determinar si la inoculación subcutánea de la cepa avirulenta RC122 desencadena la producción de anticuerpos específicos (IgG total) en sangre y leche de vacas y vaquillonas pertenecientes al grupo vacunados y al grupo no vacunados (control), se llevó a cabo la técnica de ELISA directo puesta a punto en nuestro laboratorio.

La técnica de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado e insolubilizado sobre un soporte la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico, que al actuar la enzima producirá un color observable y cuantificable en un espectrofotómetro. [Cultek, 2006]

En este trabajo se llevó a cabo el método de ELISA directo, basado en la sensibilización del soporte con la cepa de *S. aureus* RC122, según se detalla en el punto 5.3 de la sección Materiales y Métodos.

### 1.1. Titulación de los anticuerpos

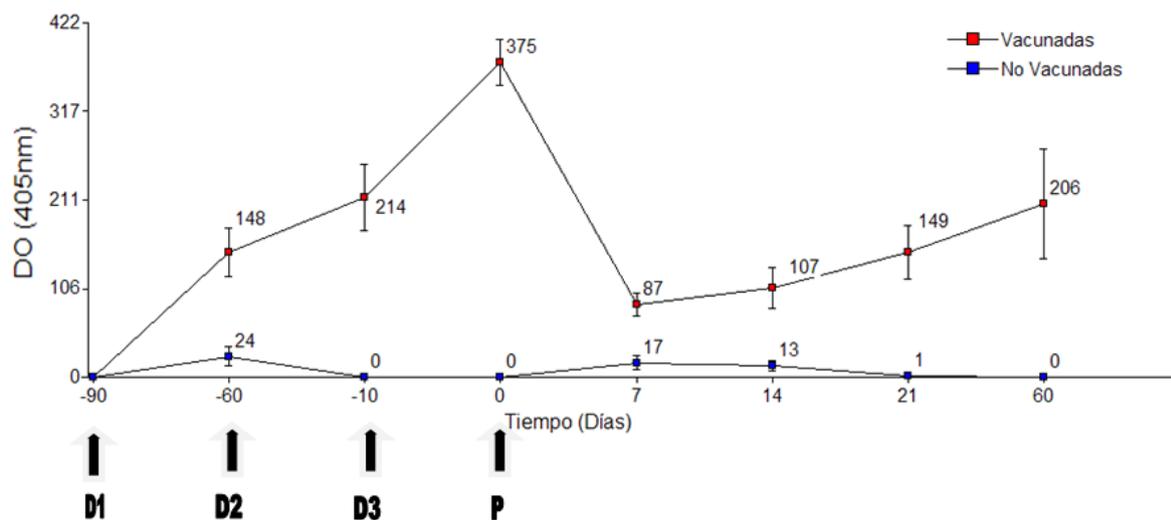
Con el fin de determinar las concentraciones óptimas de trabajo de los anticuerpos específicos (IgG total), se titularon las muestras de sangre y leche de los animales de los GV y GNV. Se determinó que las diluciones adecuadas de trabajo son 1/80 y 1/10 para sangre y leche, respectivamente. Por otro lado, se observó que la dilución de IgG total a utilizar sería 1/5000 para sangre y 1/2500 para leche. Estas diluciones permiten utilizar dichos reactivos lo suficientemente diluidos como para evitar reacciones inespecíficas y para economizar el uso de anticuerpo.

### 1.2. Niveles de IgG total en sangre de vacas y vaquillonas

Para determinar la capacidad de la cepa avirulenta RC122 de estimular la producción de anticuerpos específicos, se utilizaron un total de 32 animales, 17 vacas y 15 vaquillonas, (GV: 16; GNV: 16), que fueron inmunizados según lo descrito en el punto 2 de Materiales y Métodos. Las muestras fueron tomadas a los tiempos - 90 (Dosis 1), - 60 (Dosis 2), - 10 (Dosis 3); 0 (periodo cercano al parto) y 7, 14, 21 y 60 días post-parto.

En primer lugar, se determinó la presencia de anticuerpos específicos en sangre sin hacer distinción a la categoría (vaca/vaquillona) a la que correspondía el animal.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. En dicha Figura, se observa una diferencia significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los niveles de IgG total en el GV con respecto al GNV luego de la inoculación de cada una de las dosis (-90, -60, -10) y a los tiempos 0, 7, 14, 21 y 60 días post-parto. El mayor aumento se observó al momento del parto (periodo de mayor susceptibilidad del animal a la mastitis), donde los niveles de anticuerpos alcanzaron su máxima concentración. Posteriormente, se detectó una disminución marcada después del parto. Sin embargo, al día 14 post-parto se observó nuevamente un aumento de los anticuerpos en sangre que alcanzaron, a los 60 días post-parto, niveles semejantes a los observados luego de la D2. Resultados similares se obtuvieron en un ensayo de vacunación y desafío previo, realizado en el laboratorio de Genética Microbiana [Pellegrino y col., 2008], donde los niveles de anticuerpos presentes en sangre, luego de cada dosis de vacuna por vía subcutánea y antes del desafío, fueron significativamente mayores en el GV.



**Figura 7.** Niveles de IgG total en sangre de vacas y vaquillonas determinada 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, D2: Dosis 2; D3: Dosis 3, P:Parto

Los niveles de anticuerpos obtenidos, podrían indicar que las vacas y vaquillonas correspondientes al GV desarrollarían una mayor protección frente a la mastitis bovina producida por *S. aureus*. En todo el ensayo, la IgG total se mantuvo en concentraciones significativamente mayores en el GV, en especial al momento del parto, donde se observa el máximo nivel de anticuerpos. Se podría deducir que aquellos animales pertenecientes a este grupo presentan una considerable protección frente a la infección en el período cercano al parto, etapa de mayor susceptibilidad a la mastitis bovina.

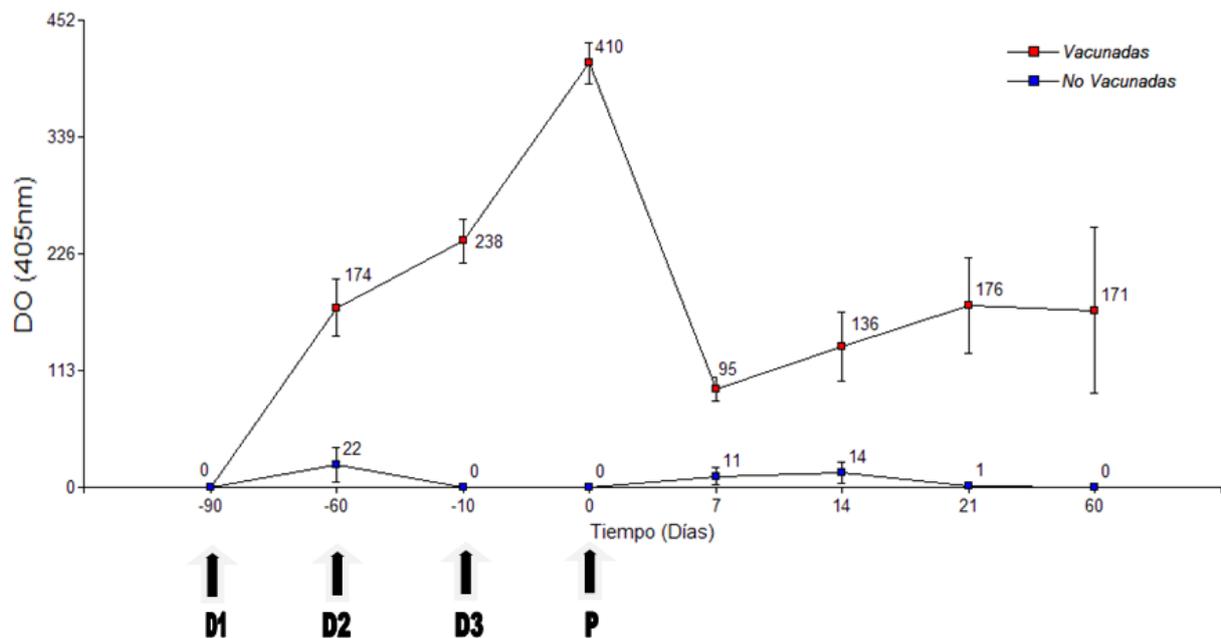
Luego de esta etapa, hacia el día 10 post-parto, se observa una disminución muy marcada en el título de anticuerpos en los animales pertenecientes al GV, alcanzando el nivel más bajo para este ensayo. Entre las causas que más se destacan como responsables de los cambios en la respuesta inmune durante el peri-parto, figuran los factores hormonales y metabólicos [Kehrl y col., 1998; Meglia, 2000]. Entre las primeras, cabe mencionar la disminución en los niveles de progesterona hacia el final de la gestación, el incremento de los estrógenos con un gran pico inmediatamente antes del parto y un incremento sostenido de los niveles de corticoesteroides. Estos últimos producen una inhibición duradera de las citoquinas IL-2 e IFN $\gamma$ , los cuales impiden la diferenciación de células plasmáticas a linfocitos y por lo tanto disminuye la producción de anticuerpos [Smith y col., 1973; Comline y col., 1974; Kimura y col., 1998; Hässig y col., 2015]. Con respecto a las causas metabólicas, están las relacionadas con las elevadas necesidades nutritivas que experimentan los animales para sobrellevar el inicio de la lactancia, resultando en un profundo balance energético negativo inmediatamente después del parto [Targowski y Klucinski, 1983; Targowski y col., 1985]. Los eventos que acontecen durante este periodo, obrarían de manera negativa sobre la capacidad de defensa del animal, y por consiguiente sobre la glándula mamaria, elevando así la susceptibilidad a las infecciones [Meglia y Mata, 2001]. Otra razón por la que se observaría esta disminución en los niveles de IgG total podría ser el transporte altamente específico desde la sangre al calostro de estas Igs [Sordillo y Steincher, 2002]. Este mecanismo de transporte moviliza grandes cantidades de IgG (particularmente IgG<sub>1</sub>) de la sangre a la glándula mamaria, proceso que comienza días antes del parto y que requiere de varios días para resintetizar la IgG perdida [Quigley, 1998].

Seguido a esto, se observó nuevamente un aumento en el título de anticuerpos en sangre, lo que podría deberse a la inoculación de la tercera dosis (D3) 10 días antes del parto, que no sólo permite generar un elevado nivel de anticuerpos durante el periparto sino también recuperar niveles altos de IgG 21 días post-parto. Debido a que la vacuna utilizada para la inoculación es una cepa viva y avirulenta, imitaría la infección natural induciendo así una amplia respuesta inmune humoral [Pellegrino y col., 2008, 2010] y celular (datos no publicados), por la activación de células B y T y de las células de memoria que permitirían la expresión y presentación de antígenos a largo plazo. De esta manera se logra restablecer los niveles de anticuerpos semejantes a los obtenidos luego de la D2.

Por otro lado, se realizó un análisis de la determinación de anticuerpos específicos en sangre de vacas y vaquillonas en forma separada, con el fin de observar las diferencias que presenta la inmunización con la cepa RC122 en cada una de las poblaciones.

En la Figura 8, se observan los niveles de anticuerpos específicos (IgG total) obtenidos por la inoculación con la cepa *S. aureus* RC122 en vacas correspondientes al GV, y en vacas correspondientes al GNV.

Al igual que lo observado con la totalidad de la población de bovinos (Figura 7) involucrados en el ensayo, se puede ver que existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los niveles de IgG total en el GV respecto al GNV. Esta diferencia se observa en todos los tiempos ensayados. Cabe destacar la importancia de la inoculación de las D1, D2, D3 correspondientes a los tiempos de muestreo -90, -60, -10 en el GV, que permitió el aumento progresivo de IgG total luego de la administración de cada una de las dosis, haciendo que al momento del parto se observara el pico más alto en el nivel de anticuerpos. De esta manera se puede inferir que las vacas pertenecientes a este grupo, presentan un nivel considerable de anticuerpos contra *S. aureus* en el periparto. Posteriormente y al igual que al analizar todos los animales en conjunto, se puede distinguir una disminución brusca del nivel de IgG total al día 7 post-parto. Luego de este día comienza un aumento lento, que llega al día 60 post-parto con niveles de anticuerpos similares a los observados luego de la inoculación de la D1. Como se puede observar, la cinética de la curva de IgG total descrita para vacas (Figura 8), lleva a cabo la misma distribución que la observada en el ensayo con vacas y vaquillonas (Figura 7).



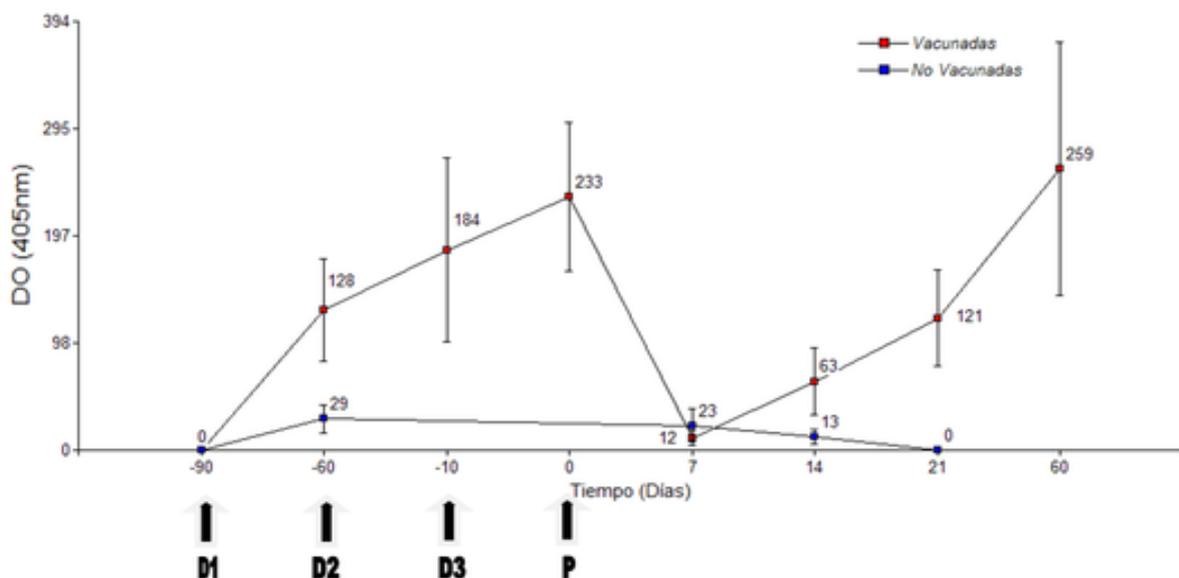
**Figura 8.** Niveles de IgG total en sangre de vacas determinada por ELISA. Las muestras de sangre fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm. . D1: Dosis 1. D2: Dosis 2. D3: Dosis 3. P:Parto

Por otro lado, la Figura 9 muestra los niveles de anticuerpos específicos (IgG total) en vaquillonas correspondientes a los GV y GNV.

Al igual que lo observado en los análisis anteriores, se ve una diferencia significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en los animales del GV respecto a los del GNV en todos

los tiempos ensayados, excepto en el tiempo 7 post-parto, donde la disminución en el nivel de anticuerpos fue muy marcada, alcanzando niveles semejantes a los encontrados para el GNV. Al igual que lo obtenido en los análisis, se observa un aumento progresivo luego de la administración de cada una de las dosis subcutánea y existe una diferencia significativa mayor ( $p < 0,05$ ) en cada uno de estos puntos en el GV respecto al GNV.

Nuevamente, el tiempo 0 (Parto) es en el que se registra el máximo nivel de IgG total en vaquillonas correspondientes al GV. Por lo tanto, las vaquillonas pertenecientes a este grupo presentarían una elevada concentración de anticuerpos en el periodo con mayor posibilidad de contraer la infección. Luego de la disminución brusca observada en el tiempo 7 post-parto, al igual que lo observado en el análisis de vacas y en el de la población en su totalidad se distingue un aumento progresivo hacia el día 60 post-parto. En este caso, el nivel de IgG total en el día 60 post-parto alcanzó niveles superiores a los obtenidos en los ensayos anteriores, de tal manera que el nivel observado en el parto y el observado en este tiempo de muestreo fueron similares.



**Figura 9.** Niveles de IgG total en sangre de vaquillonas determinada 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. D2: Dosis 2. D3: Dosis 3. P:Parto

Sobre la base de los resultados obtenidos y el análisis de anticuerpos específicos observados para cada una de las poblaciones es posible determinar las diferencias en la respuesta inmunológica que presentan las vaquillonas con respecto a las vacas adultas. Estos resultados fueron los esperados debido a que las vaquillonas presentan un sistema inmunológico inmaduro incapaz de producir niveles de anticuerpos similares a los observados en vacas vacunadas adultas. Comparando la cinética de las curvas de IgG total

en sangre se observa que las máximas diferencias se encuentran en el momento del parto (233 vs 410) y en el tiempo 7 post-parto (0 vs 95) para vaquillonas y vacas respectivamente. En ambos tiempos las vaquillonas vacunadas presentan menores niveles de anticuerpos, por lo tanto, es posible que exista una mayor protección sistémica frente a la mastitis bovina en vacas adultas con respecto a vaquillonas. Sin embargo, luego de este periodo los niveles de anticuerpos vuelven a recuperarse obteniéndose resultados inferiores pero cercanos a los de las vacas vacunadas adultas.

### 1.3. Niveles de IgG total en leche de vacas y vaquillonas

Con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos específicos en leche, se utilizaron las mismas 32 vacas y vaquillonas que en el ensayo anterior. Para ello y como se describe en los puntos 4 y 5 de Materiales y Métodos, se extrajo el suero de leche y se llevó a cabo la determinación de IgG total. Las muestras utilizadas en este ensayo corresponden a los tiempos de muestreo 7, 14, 21, 60 y 90 días post-parto.

En primer lugar, se determinó y analizó la presencia de anticuerpos específicos en sueros de leche de vacas y vaquillonas pertenecientes al GV y al GNV sin hacer distinción a la categoría (vaca/vaquillona) a la que correspondía el animal.

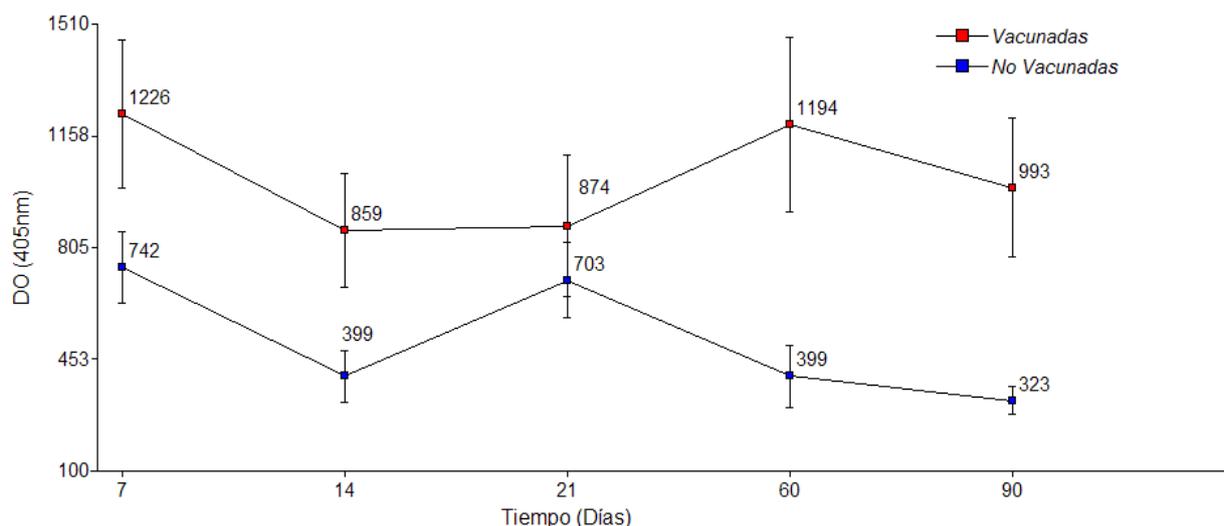
En la Figura 10 se observan los niveles de IgG total obtenidos al realizar la determinación de anticuerpos específicos en sueros de leche de vacas y vaquillonas pertenecientes a ambos grupos (GV y GNV).

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de leche tomadas luego del parto, mostraron que los animales provenientes del GV presentaron diferencias significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en el nivel de anticuerpos en los tiempos 7, 14, 60 y 90 con respecto al GNV. La excepción se observó en el día 21 donde, los niveles de IgG total para cada uno de los grupos no presentaron diferencia significativa. Esto indica la presencia de anticuerpos específicos en leche originados a partir de la inoculación subcutánea con la cepa avirulenta RC122.

Como se describe en un informe de capacitación técnico empresarial en leche [COMUNIV, 2006] el calostro del bovino tiene tres tipos de Ig: IgA, IgM, e IgG para la cual se presentan dos isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>. La mayor parte de la IgG en el calostro es IgG<sub>1</sub>. Ambas IgGs se movilizan al calostro por un transporte altamente específico que mueve grandes cantidades de IgG (particularmente IgG<sub>1</sub>) desde la sangre a la glándula mamaria, proceso que comienza aproximadamente ocho semanas antes del parto y se acentúa de dos a tres semanas antes del parto. Posteriormente la vaca requiere de algunas semanas para recuperar la IgG perdida. Esto explicaría la disminución tan marcada en el nivel de anticuerpos en leche que se presenta hacia el día 14 post- parto lo que podría deberse a un

lavado natural de los mismos por el ordeño diario y también al cese paulatino de la calostrogénesis. A su vez, podría explicar el descenso brusco en el nivel de IgG total observado en sangre hacia el día 7 post-parto. Luego puede observarse un incremento lento y progresivo alrededor del día 21 y que continua hacia el día 90 post-parto, lo que supone un nuevo traspaso de anticuerpos de sangre a leche. Este coincide con el aumento observado en sangre a los mismos tiempos, debido a una respuesta inmunológica de memoria originada por una vacuna viva avirulenta.

Los anticuerpos que aparecen en leche luego de un estímulo antigénico como la entrada natural de un patógeno o la administración local de un antígeno, pueden ser sintetizados minoritariamente en forma local o transportada desde la sangre. Este último proceso es el más efectivo, ya que es en los órganos linfáticos periféricos donde se encuentran mayoritariamente los linfocitos productores de anticuerpos [Guidry y col., 1980a; Guidry y col., 1980b; Anderson y col., 1986; Mackie y Logan, 1986; Sordillo y Nickerson, 1988; Caffin y Poutrel, 1988; Bastida-Corcvera, 1992; Guidry y col., 1993; Verbeet y col., 1995; Brandan y col., 2007]. Las células sanguíneas ante un estímulo (citoquinas) producido por células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos) ubicadas en la glándula, proliferan y sintetizan Igs, muchas de las cuales una vez en la glándula opsonizan a las bacterias presentes favoreciendo su fagocitosis [Paape y col., 2000; O'Brien y col., 2000; O'Brien y col., 2001; Sordillo y Streicher, 2002; Sordillo, 2005; Pereyra y col., 2014].

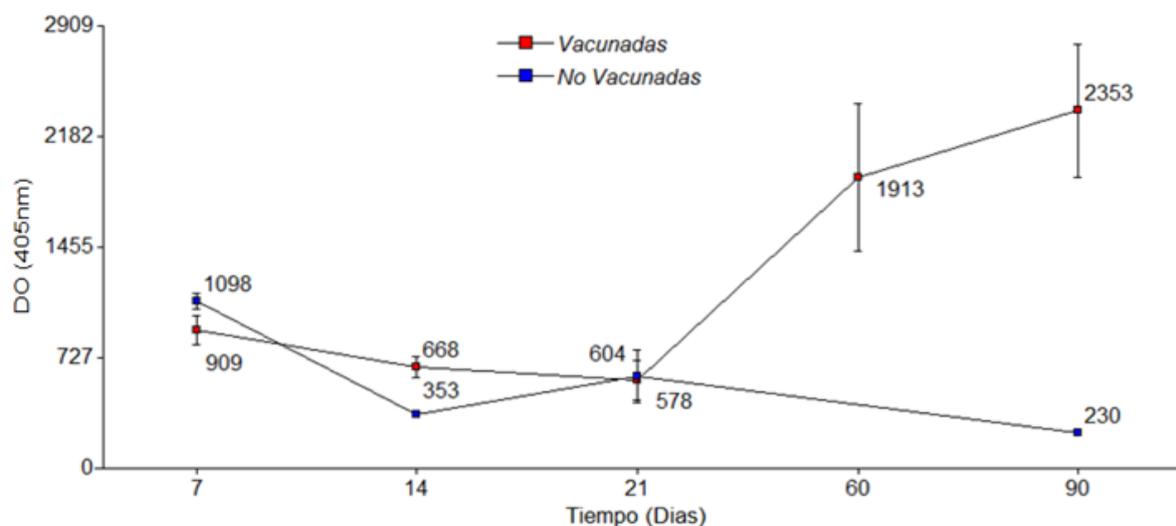


**Figura 10.** Niveles de IgG total en leche de vacas y vaquillonas determinados por ELISA. Las muestras de leche fueron diluidas 1/10. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm.

Al igual que lo realizado en el ensayo de sangre, se llevó a cabo un análisis diferencial para leche de vacas y vaquillonas.

En la Figura 11, se observan los niveles de anticuerpos específicos en leche (IgG total) obtenidos por la inoculación con la cepa *S. aureus* RC122 en vacas correspondientes a los GV y GNV.

Al realizar el análisis de los resultados obtenidos para sueros de leche de vacas, se puede observar que existen diferencias significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) en el GV con respecto al GNV en los tiempos 14 y 90. En el día 7 post-parto se puede observar que el nivel de IgG total en leche de vacas vacunadas es inferior al de vacas no vacunadas, aunque es mayor al observado a los días 14 y 21 post-parto para vacas vacunadas. Esto tendría la misma explicación que se mencionó en la discusión de los resultados anteriores. El aumento brusco en el título de anticuerpos hacia el día 60 y más aún hacia el día 90 post-parto, podría indicar el nuevo traspaso de IgG total de sangre a la glándula mamaria producido por una respuesta inmunológica de memoria.

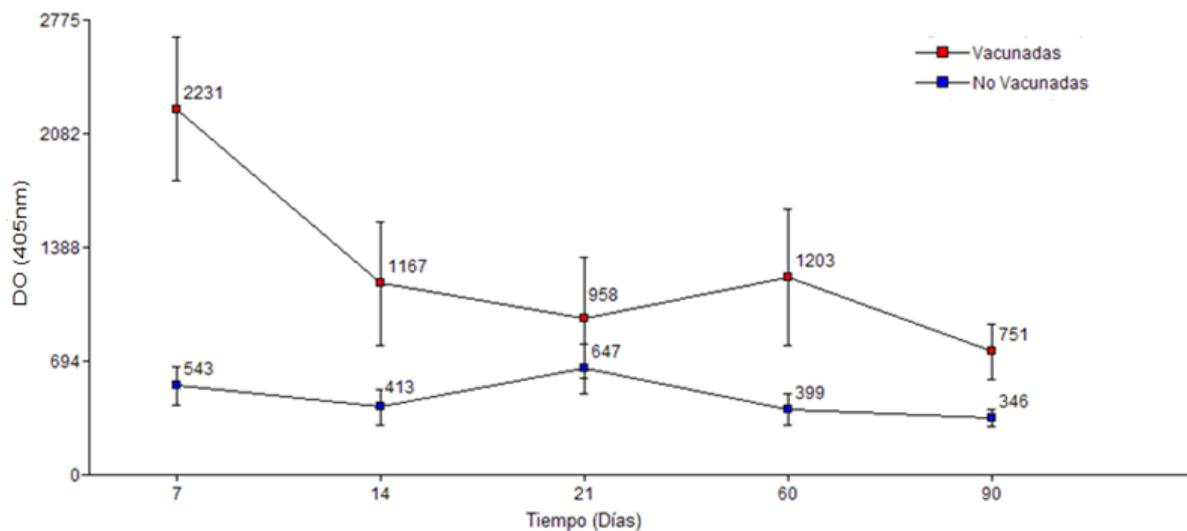


**Figura 11.** Niveles de IgG total en leche de vacas determinada por ELISA. Las muestras de leche fueron diluidas 1/10. Los datos son expresados como la media + E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm.

Por otro lado, la Figura 12 muestra los niveles de anticuerpos específicos en leche (IgG total) obtenidos por la inoculación con la cepa *S. aureus* RC122 en vaquillonas de los GV y GNV.

En este análisis, se puede observar que el nivel de IgG total obtenido para el GV es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al obtenido para el grupo no vacunados en todos los tiempos de muestreo excepto para el día 21.

A diferencia de lo observado en el análisis de vacas, en el tiempo 7 post-parto es en el cual se obtiene el máximo nivel de IgG total. Esto podría deberse al paso de anticuerpos de sangre a leche durante la formación del calostro. Luego, se puede ver una disminución brusca en el nivel de anticuerpos hacia el día 14 post-parto y aún más marcada hacia el día 21. Esta tendencia de disminución continúa en los siguientes tiempos de muestreo a diferencia de lo observado en el análisis de vacas, en donde los niveles de anticuerpos aumentaban considerablemente luego del día 21. Una vez realizado el análisis de la determinación de IgG total en leche para cada una de las poblaciones por separado es posible observar las diferencias que presentan.



**Figura 12.** Niveles de IgG total en leche de vaquillonas determinada por ELISA. Las muestras de leche fueron diluidas 1/10. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E. de los valores de densidad óptica (DO) leídos a 405nm.

Al analizar las cinéticas de las curvas de anticuerpos, se puede ver una clara diferencia en los resultados obtenidos entre las diferentes poblaciones. En los tiempos cercanos al parto (7 y 14 post-parto) se muestra que los niveles de IgG total en las vacas adultas son muy inferiores en relación a los observados para vaquillonas. Esto indicaría un traspaso más eficiente de anticuerpos de sangre a leche en vaquillonas que en vacas adultas. Observando los tiempos más alejados al parto (60 y 90 post-parto), se puede ver un aumento de los niveles de anticuerpos en vacas del GV, a diferencia de lo observado en vaquillonas del GV en las que se observa una marcada disminución. Indicando un efectivo traspaso de IgG total de sangre a la glándula mamaria, en vacas dado por una respuesta inmunológica de memoria.

## 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD OPSÓNICA DE SUEROS DE SANGRE DE VACAS Y VAQUILLONAS VACUNADAS CON LA MUTANTE *S. aureus* RC122

Los neutrófilos juegan un papel clave en las defensas de la glándula mamaria, su rápida movilización desde la sangre hacia la leche, es crucial para prevenir la proliferación de bacterias de crecimiento rápido y la subsecuente aparición de mastitis aguda [Paape y col., 2003, Pereyra y col., 2014]. Estos eliminan al patógeno principalmente por fagocitosis y muerte intracelular empleando numerosos mecanismos antibacterianos. Los anticuerpos del tipo IgG, sobre todo del isotipo IgG<sub>2</sub>, son capaces de recubrir a los microorganismos y actuar como opsoninas, ya que promueven la fagocitosis de estos. Los neutrófilos poseen además receptores para los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas los que guardan mayor afinidad por las Igs que se encuentran recubriendo a un microorganismo, que a las Igs libres.

La fagocitosis tiene dos finalidades. En primer lugar, incluir al agente extraño dentro de vesículas denominadas fagosomas, que luego se unirán con los lisosomas, formando de esta manera el fagolisosoma. En el interior de éste, se liberan sustancias microbicidas, como el ROIs (intermediarios reactivos del oxígeno), NO (óxido nítrico) y enzimas líticas que colaboran en la destrucción de los microorganismos. La otra función importante, consiste en tomar los péptidos antigénicos de los microorganismos y separarlos, para poder procesarlos y unirlos a las moléculas del CMH II y para que de esta manera los macrófagos puedan actuar como células presentadoras de antígeno [Brandan y col., 2007].

El reclutamiento de neutrófilos a la glándula mamaria bovina varía en intensidad y rapidez de acuerdo con el agente infeccioso [Pöhlmann-Dietze y col., 2000]. En mastitis bovina subclínicas experimentales por *S. aureus* se demostró un reclutamiento moderado (> 10<sup>6</sup> células/ml) y tardío (entre 24 y 48 horas postinfección) de neutrófilos en glándulas mamarias inoculadas [Riollet, 2000].

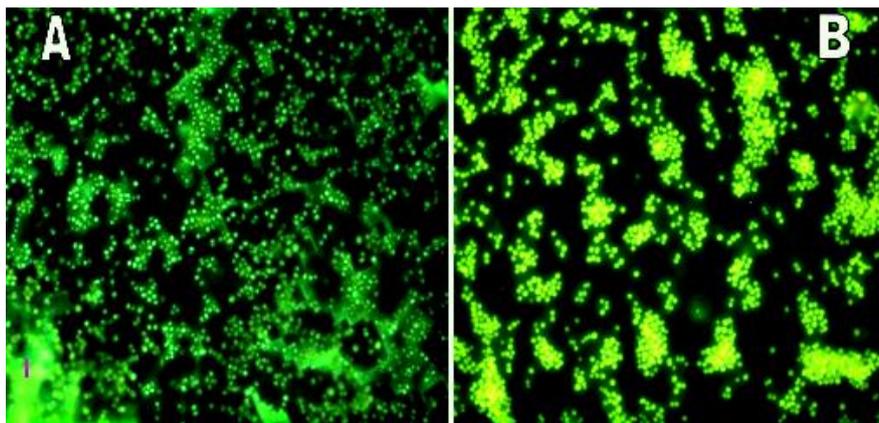
Como define Pellegrino en su tesis doctoral (Mastitis bovina: Ensayos experimentales de vacunación en bovinos con la cepa *S. aureus* RC122 para su estudio en la prevención de la enfermedad, 2010), hay diversas investigaciones que sugieren como estrategia para controlar la mastitis, aumentar la concentración de anticuerpos opsónicos en leche, disminuyendo el número de neutrófilos necesarios para proteger la glándula, ya que para prevenir la proliferación de bacterias productoras de mastitis bovina se requiere niveles de neutrófilos superiores a los observados en ensayos de reclutamientos frente a mastitis bovinas experimentales.

### 2.1. Ensayo de fagocitosis frente a cepas homólogas

Para la determinación de la capacidad opsonica de sueros de sangre de vacas y vaquillonas GV y GNV, se llevó a cabo un ensayo de fagocitosis frente a las cepas de *S. aureus* RC122, y su parental virulenta RC108.

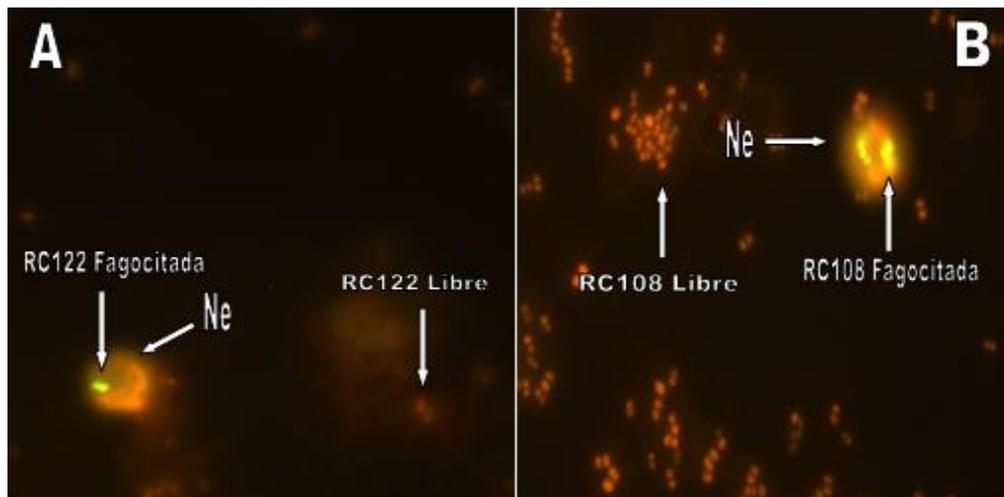
En primer lugar se observaron los controles, que correspondían a bacterias opsonizadas solas (sin neutrófilos), neutrófilos solos (sin bacterias) y bacterias sin opsonizar con neutrófilos. Además, se observaron los extendidos de las bacterias opsonizadas con neutrófilos, en los cuales se examinaron 200 células y se determinó el número de bacterias internalizadas.

La Figura 13 muestra la cepa de *S. aureus* RC122 (Figura 13 A) y RC108 (Figura 13 B) marcadas con FITC. En dicha Figura, se pueden observar cocos pequeños e irregulares agrupados en racimos, característicos de los *Staphylococcus spp*, Estas imágenes corresponden al control de bacterias opsonizadas sin neutrofilos.



**Figura 13.** Microfotografía de bacterias opsonizadas (con anticuerpos específicos de animales vacunados con la cepa *S. aureus* RC122) A: RC122 marcada con FITC. B: RC108 marcada con FITC. La fotografía fue obtenida a 1000X en microscopio de fluorescencia.

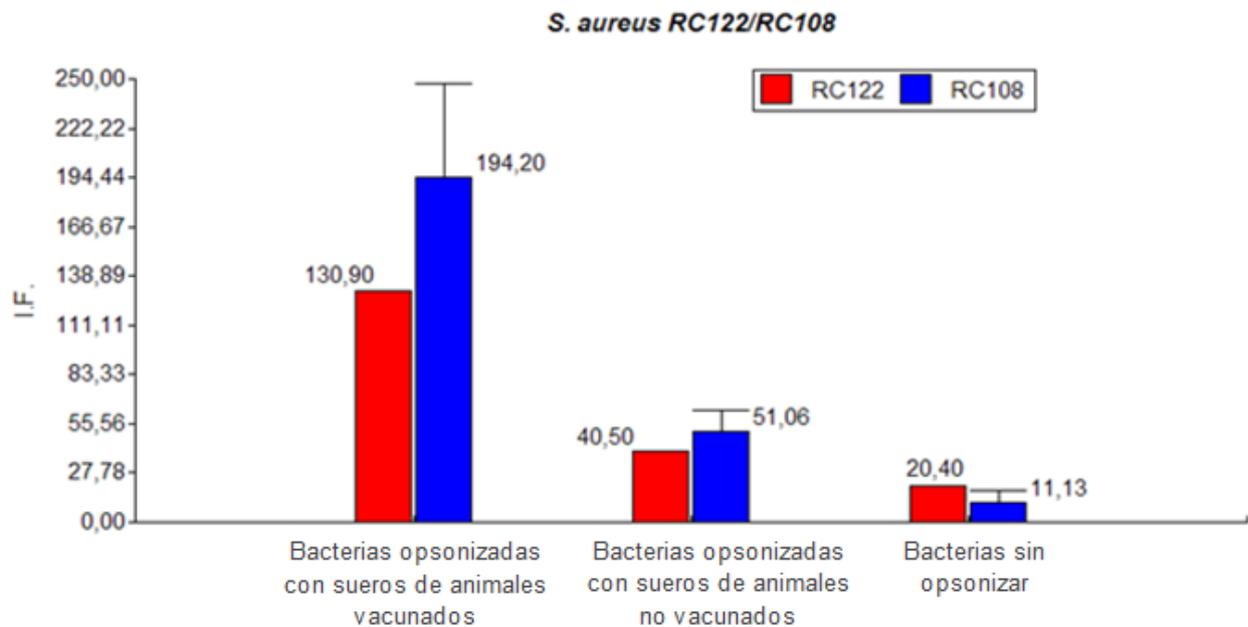
En la Figura 14 se muestra uno de los resultados obtenidos en el ensayo de fagocitosis. En la Figura 14 A se puede observar la cepa RC122 (verde) fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne) que se diferencia de las bacterias libres (anaranjado) por el agregado de bromuro de etidio como agente neutralizador de la fluorescencia. De esta manera, aquellas bacterias fagocitadas fueron capaces de emitir fluorescencia, a diferencia de las bacterias libres que no lo hicieron. Lo mismo puede observarse en la Figura 14 B para la cepa RC108.



**Figura 14.** Fagocitosis *in vitro* por neutrófilos bovinos de cepas de *S. aureus* A: Cepa RC122 fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne) y cepa RC122 libre. B: RC108 fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne) y RC108 libre. La fotografía fue obtenida a 1000X en microscopio de fluorescencia.

Para determinar la capacidad opsónica de los sueros de sangre de vacas y vaquillonas, se determinó un índice de fagocitosis (IF) teniendo en cuenta el número de bacterias internalizadas por neutrófilo. En la Figura 15 se observan los valores de IF al opsonizar las cepas RC122 y RC108, con *pools* de sueros de vacas y vaquillonas del GV y GNV correspondientes a todos los tiempos de muestreo y ambas cepas sin opsonizar. Los resultados obtenidos para la cepa RC122 muestran la capacidad opsónica del suero proveniente del GV (IF: 130,9), el cual fue tres veces mayor al IF observado para el GNV (IF: 40,5) y seis veces mayor al del grupo sin opsonizar (IF: 20,4). Estos resultados estarían indicando la capacidad de los sueros provenientes de animales inoculados de generar anticuerpos opsónicos frente a la cepa vacunal. Como se mencionó anteriormente, los neutrófilos poseen receptores para los fragmentos Fc de los anticuerpos. Estos receptores tienen mayor afinidad por las Igs que se encuentran recubriendo a un microorganismo, que por las Ig libres [Brandan y col.; 2007].

La capacidad opsónica observada en el GV (expresada en IF), es similar a los resultados encontrados en el ensayo de ELISA (Figura 7), donde se observa una diferencia significativamente mayor en el título de anticuerpos en el GV con respecto al GNV en todos los tiempos de muestreo.



**Figura 15.** Índices de Fagocitosis (IF) frente a la cepa mutante de *S. aureus* RC122 y parental RC108 opsonizadas con *pools* de sueros de sangre de vacas y vaquillonas vacunadas, no vacunadas y ambas sin opsonizar. Las muestras fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados con el único valor IF obtenido para esta experiencia.

En el caso de la cepa parental RC108, los resultados muestran que existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los IF obtenidos con los *pools* de sueros del GV con respecto a los obtenidos con el GNV y al grupo sin opsonizar. Por otro lado, se observa que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los IF obtenidos a partir suero de animales del GNV y los obtenidos a partir de bacterias sin opsonizar (Figura 15).

Los resultados muestran la capacidad opsonizante del suero obtenido del GV (IF: 194,2) aproximadamente cuatros veces mayor respecto a la capacidad opsonizante del GNV (IF: 51,06). Además, el IF fue aproximadamente diecisiete veces mayor en el GV respecto al del grupo sin opsonizar (IF: 11,13).

Se puede observar que el IF obtenido con el suero del GV es superior en la cepa RC108, este resultado podría indicar que existe una mayor capacidad opsonizante frente a la cepa parental en comparación con la cepa vacunal.

Además estos resultados, indicarían que los anticuerpos presentes en animales inmunizados con la cepa mutante RC122 son capaces de reconocer antígenos presentes en la cepa de parental virulenta de *S. aureus*. Estos resultados son similares a los hallados por Pellegrino y col (2008 ó 2010), en un ensayo de protección. Esto estaría indicando que la vacunación del rodeo comercial con la cepa mutante, sería capaz de proteger a los animales frente a otras cepas de este microorganismo. La falta de diferencia significativa entre el los GNV y sin opsonizar, podría indicar la elevada capacidad como inmunógeno que presenta la cepa mutante avirulenta.

### 2.2. Ensayo de fagocitosis frente a cepas heterólogas

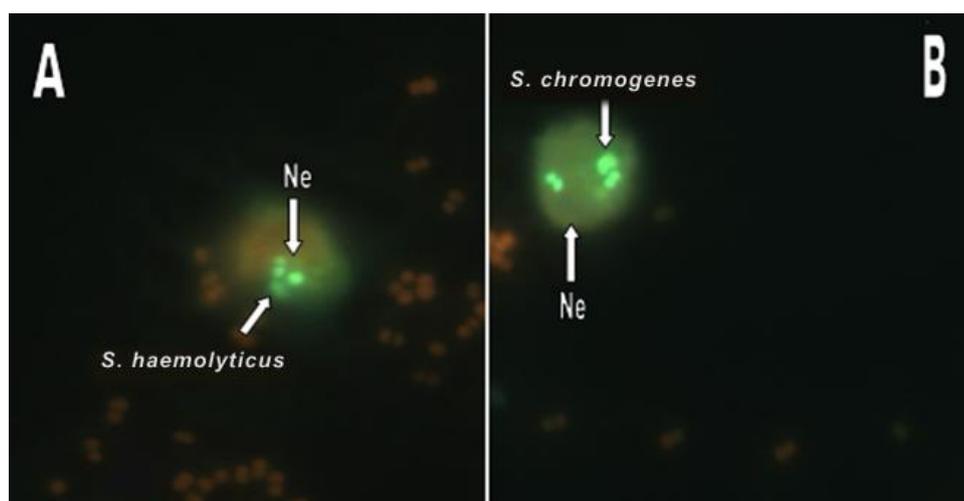
Con el objetivo de observar si los anticuerpos presentes en la sangre de los animales vacunados eran capaces de reaccionar con diferentes especies de microorganismos productores de mastitis bovina, se realizó un ensayo de fagocitosis utilizando cepas de bacterias pertenecientes al mismo y a diferentes géneros.

Para determinar la capacidad opsonina de estos anticuerpos frente a cepas heterólogas de *Staphylococcus* se usaron dos especies de microorganismos reconocidos por su capacidad de producir mastitis bovina, una cepa de *S. haemolyticus* y una cepa de *S. chromogenes*, ambos pertenecientes al grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) y aisladas a partir de leche con elevado RCS.

Además, para observar si la inmunización con la vacuna estimula la producción de anticuerpos opsonizantes capaces de unirse a bacterias productoras de mastitis bovina muy diferentes taxonómicamente a la cepa RC122, se realizó el ensayo de fagocitosis, utilizando una cepa de *Streptococcus uberis* aislada de mastitis bovina y una cepa de *Escherichia coli* aislada de alimentos bovinos.

Para este experimento, se utilizaron los mismos *pools* de sueros obtenidos en todos los tiempos de muestreo que en el ensayo anterior, y también se determinó la capacidad opsonica de los neutrófilos frente a estas cepas sin opsonizar.

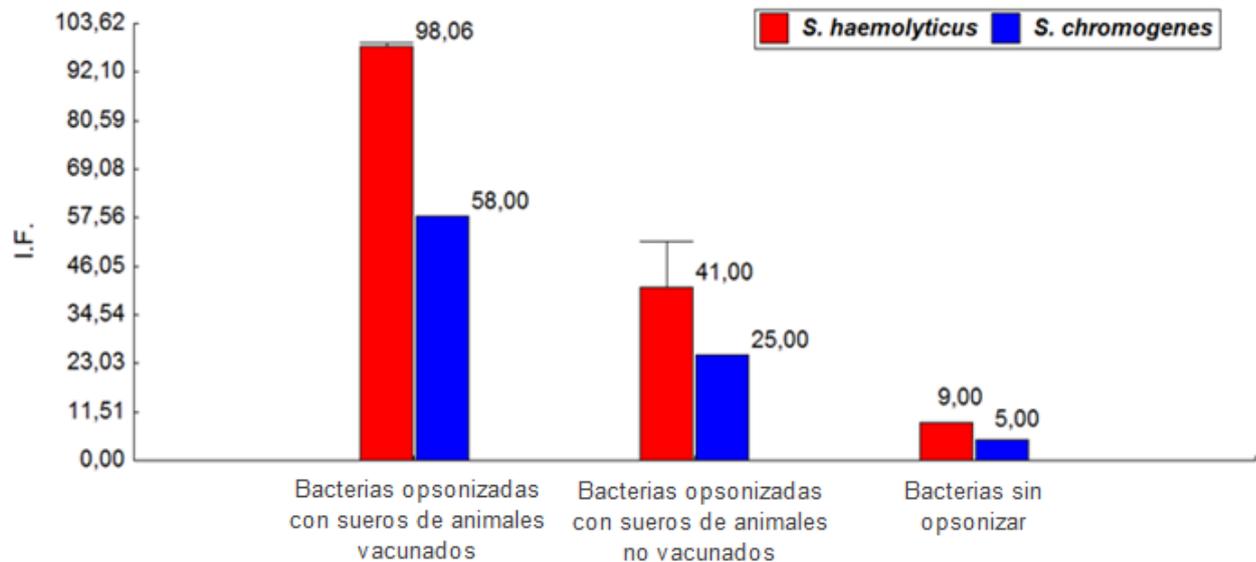
En la Figura 16 se observa al microscopio de fluorescencia la cepa de *S. haemolyticus* (Figura 16 A) y la cepa de *S. chromogenes* (Figura 16 B) dentro de neutrófilos bovinos luego de realizar el ensayo de fagocitosis *in vitro*.



**Figura 16.** Fagocitosis *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus* A: *S. haemolyticus* fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne). B: *S. chromogenes* fagocitada por un neutrófilo bovino (Ne). La fotografía fue obtenida a 100X en microscopio de fluorescencia.

En el Figura 17 se observan los valores de IF obtenidos al opsonizar la cepa de *S. haemolyticus* y *S. chromogenes*.

Con respecto a la cepa de *S. haemolyticus*, los resultados muestran que existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los IF obtenidos con los *pools* de sueros del GV con respecto a los obtenidos con los sueros del GNV. También se observa que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los IF obtenidos entre el GNV y el grupo sin opsonizar. La capacidad opsónica los sueros del GV (IF: 98,06) es de dos veces mayor a la del GNV (IF: 41) y aproximadamente diez veces mayor a la del grupo sin opsonizar (IF: 9).



**Figura 17:** Índice de Fagocitosis (IF) frente a las cepas de *S. haemolyticus* y *S. chromogenes* opsonizada con *pools* de sueros sanguíneos de vacas y vaquillonas vacunadas con la cepa RC122, no vacunadas y sin opsonizar. Los datos son expresados como la media de IF  $\pm$  E.E. Las muestras fueron diluidas 1/80.

Por otro lado, para la cepa de *S. chromogenes* se puede ver que el IF obtenido con los *pools* de sueros del GV (IF= 58) supera en dos veces al IF para el GNV (IF: 25) y en más de once veces al obtenido con la cepa sin opsonizar (IF: 5). Estos valores de IF son menores a los obtenidos en los ensayos frente a cepas homólogas.

Notoriamente, el IF obtenido con el suero del GV es superior en la cepa de *S. haemolyticus*, lo que podría indicar una mayor capacidad opsónica y por lo tanto una mayor protección de los animales frente a esta cepa con respecto a otra especie de la familia como es *S. chromogenes*.

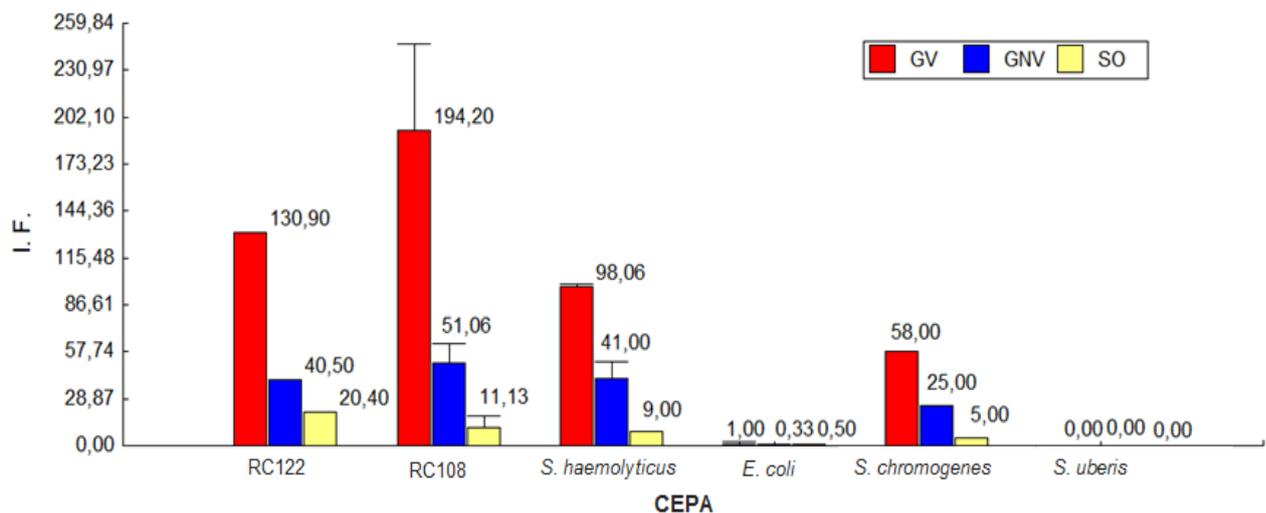
De todas formas, estos resultados indicarían que la vacunación con la cepa de *S.aureus* RC122 no sólo genera anticuerpos opsónicos, que dan protección a los animales frente a microorganismos homólogos, sino que también reconocen epitopes presentes en especies heterólogas pertenecientes a la Familia *Staphylococaceae* especialmente SCN, cada vez más importantes en casos de mastitis bovina. De esta manera, permite dar un alto

rango de prevención frente a microorganismos productores de mastitis bovina debido a que el 90% de los casos de esta enfermedad son producidos por miembros que integran dicha familia bacteriana. Esta característica, sumada a la marcada avirulencia, apunta a su uso como una medida de prevención muy efectiva.

Por otra parte, los resultados del ensayo de fagocitosis con neutrófilos bovinos frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis*, confirman la especificidad de los anticuerpos opsónicos ya que se puede determinar la ausencia de fagocitosis con la cepa de *S. uberis* y un IF muy bajo en el ensayo con la cepa de *E. coli*. (Media de IF= 1 en el GV). Estos resultados indicarían que la vacunación con *S. aureus* RC122 no genera anticuerpos opsónicos frente a cepas de microorganismos alejados taxonómicamente.

A modo de resumen, la Figura 18 muestra los IF obtenidos al opsonizar cada una de las cepas con los *pools* de sueros de vacas y vaquillonas del GV, GNV; y de las cepas sin opsonizar.

Como se puede observar, el mayor IF, se presenta en la cepa RC108, seguido por el valor obtenido para la cepa RC122 y las cepas heterólogas *S. haemolyticus* y *S. chromogenes*. Como se describe anteriormente esto se podría deber a que la vacunación con la cepa de *S. aureus* RC122 genera anticuerpos opsónicos a partir de epitopes presentes en los microorganismos que forman parte de la familia *Staphylococcaceae*.



**Figura 18.** Índice de Fagocitosis (IF) por neutrófilos bovinos contra diferentes cepas: RC122 (mutante utilizada para la vacunación), RC108 (cepa parental virulenta), *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *E. coli* y *S. uberis*. Las cepas fueron opsonizadas con *pools* de sueros sanguíneos pertenecientes al GV: grupo vacunadas, al GNV: grupo no vacunadas y SO: sin opsonizar, correspondientes a todos los tiempos de muestreo. Las muestras fueron diluidas 1/80. Los datos son expresados como la media  $\pm$ E.E. de los valores de IF.

### 3. ANÁLISIS DEL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE EN ANIMALES VACUNADOS Y NO VACUNADOS

Con el objetivo de observar el efecto de la inoculación con la cepa vacunal sobre el estado sanitario de la ubre en los animales vacunados respecto del GNV, se midió la producción de leche (en litros), el aislamiento de bacterias patógenas en leche y Recuento Celular Somático (RCS) a los 60 días post-parto del ensayo de vacunación. Los mismos fueron obtenidos de un trabajo realizado anteriormente por Richardet, y col., (2013) donde se realiza un análisis de datos pertenecientes a todos los tiempos de muestreo. Los datos analizados corresponden a los obtenidos de todas las vacas y vaquillonas involucradas en el ensayo de vacunación, pertenecientes a los GV y GNV.

Para realizar este objetivo se eligió el tiempo 60 post-parto debido a que se intentó analizar un tiempo de muestreo en el cual se eviten las curas espontáneas de mastitis producidas generalmente durante las primeras semanas después del parto [Calvinho y col., 1997] y además observar la capacidad de respuesta de las células con memoria, y por otro lado analizar un tiempo en el que la producción de leche se viera estabilizada.

#### 3.1. Análisis de producción de leche

Se analizaron los datos de producción de leche total de cada uno de los animales pertenecientes al ensayo de vacunación. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos en este análisis.

**Tabla 4.** Media de la producción de leche (en litros), número de animales utilizados y el p-valor obtenido en el análisis estadístico ANOVA para los Grupos Vacunados y No Vacunados.

GRUPO	Nº de animales	m (litros)	p- valor
Vacunados	41	32,9195122	0,04251267
No Vacunados	39	29,6	

A partir de los resultados obtenidos se puede observar que existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre la producción lechera de los animales pertenecientes al GV con respecto a la producción del GNV. Estos resultados estarían indicando que los animales vacunados tendrían un mejor estado de salud de la ubre que se traduciría en un aumento en la producción de leche. Resultados obtenidos en un trabajo anterior de vacunación contra *S. aureus* [Mata y col., 2002] demostraron que no hay diferencias significativas entre los grupos vacunados y control usados en su trabajo. Leitner y col., (2000) hallaron un incremento significativo en producción de leche en animales vacunados contra *S. aureus*. Por el

contrario, otros informaron una disminución con una vacunación contra *E. coli* [Musser y Anderson, 1996], ausencia de algún efecto con bacterina-toxide contra *S. aureus* [Pankey y col., 1985] o con una vacuna contra *E. coli*, cepa J5. [Hogan y col., 1995].

### 3.2. Análisis de infección

En este análisis se utilizaron los datos de infección que presentaron los animales pertenecientes al GV y al GNV. Se consideró animales con infección a aquellos en los que se aisló microorganismos productores de mastitis bovina en al menos uno de sus cuartos mamarios y que hayan tenido un promedio de RCS de sus cuartos superior a 250.000 cels/ml.

Los microorganismos aislados de vacas y vaquillonas pertenecientes al ensayo correspondieron a bacterias productoras de mastitis como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Streptococcus spp*, Enterobacterias, *Micrococcus spp*, y *Corinebacterium bovis*.

A partir de estos resultados se realizó un análisis comparativo del número de infecciones entre el GV y el GNV, agrupando a aquellos animales que presentaban infección por microorganismos integrantes de la Familia *Staphylococcaceae* en forma única o con co-infección con otros microorganismos. De la misma forma, se realizó un análisis incluyendo las infecciones producidas por el resto de los microorganismos aislados.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos al analizar el nivel de infección producida por microorganismos de la Familia *Staphylococcaceae* en 36 animales (vacas y vaquillonas) pertenecientes al GV y al GNV.

**Tabla 5.** Porcentaje de infección por miembros de la Familia *Staphylococcaceae* obtenido para vacas y vaquillonas de los Grupos Vacunados y del No Vacunados. SNC: *Staphylococcus coagulasa negativos*

Microorganismos	Grupo Vacunados	Grupo No Vacunados
SCN SOLO	2	5
SCN + OTRO	1	1
<i>S. aureus</i> SOLO	2	2
<i>S.aureus</i> + OTRO	0	1
SCN + <i>S. aureus</i>	1	2
Totales	6	11
Nº total de animales	48	46
% de infección	<b>12,50%</b>	<b>23,90%</b>

Se puede observar que el porcentaje de infecciones en el GNV es prácticamente el doble del correspondiente al GV. Esto indicaría una protección eficaz de la vacunación

frente a microorganismos productores de mastitis bovina pertenecientes a la Familia *Staphylococcaceae*. Estos resultados se complementan con los observados en el ensayo de fagocitosis donde la capacidad de producir anticuerpos opsónicos no sólo se veía en desafíos frente a cepas homólogas, sino que se ampliaba a cepas heterólogas pertenecientes a esta familia. Por lo tanto, la inoculación con la cepa RC122 sería eficaz para preservar el correcto estado de sanidad de la ubre y proteger a los animales vacunados frente a microorganismos que formen parte de esta familia. Este resultado mostraría la gran importancia de la vacunación para proteger a los animales productores de leche, debido a que el 90% de las mastitis bovinas son producidas por *Staphylococcus spp.*

En su trabajo Mata y col., (2002) obtuvo como resultado, al igual que lo observado en este ensayo, un porcentaje de infección subclínica por *S. aureus* en el grupo no tratadas superior al doble de lo observado en el grupo tratadas.

Los presentes resultados indicarían un efecto positivo de la vacunación sobre la incidencia de mastitis a estos patógenos.

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos al analizar el número de infecciones producidas por otros microorganismos aislados, en bovinos pertenecientes los GV y GNV.

**Tabla 6.** Porcentaje de infección por otros microorganismos productores de mastitis bovina en vacas y vaquillonas pertenecientes a los Grupos Vacunados y No Vacunados.

Microorganismos	Grupo Vacunados	Grupo No Vacunados
GRAM (-)	2	1
<i>Streptococcus spp.</i>	4	1
<i>Micrococcus spp.</i>	1	0
<b>TOTALES</b>	7	2
<b>N° total de animales</b>	48	46
<b>% de infección</b>	14,58%	4,35%

Estos resultados muestran un porcentaje de infección superior en el GV con respecto al GNV. El porcentaje obtenido en el GV es ampliamente mayor que el encontrado para el GNV, lo que indicaría la incapacidad de la inoculación con la cepas de *S. aureus* RC122 de proteger a los animales vacunados frente a microorganismos diferentes a los pertenecientes a la Familia *Staphylococcaceae*. De la misma forma a lo observado en el análisis anterior, estos resultados se correlacionan con los obtenidos en el ensayo de fagocitosis, donde se determina que la vacunación no es capaz de producir anticuerpos opsónicos frente a microorganismos alejados taxonómicamente a la cepa vacunal.

### 3.3. Análisis de Recuento Celular Somático (RCS)

Las células somáticas son un componente normal de la secreción láctea, compuesta por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales en menor medida, que ante situaciones de desafío antigénico de la glándula mamaria, responden con un incremento en número y cambios en su composición [Craven y Williams, 1985; Mata y col, 2002]. A partir de los datos de RCS para cada uno de los animales pertenecientes al ensayo de vacunación, se realizó un análisis para determinar diferencias en este parámetro para cada grupo. En primer lugar se obtuvo la media de RCS para el GV y el GNV, luego, las mismas se transformaron a escala logarítmica natural.

En la Tabla 7 se muestra el resultado de logaritmo de las medias de RCS obtenido para el GV y para el GNV, acompañados del p-valor determinado al realizar el análisis estadístico ANOVA. A partir de los resultados obtenidos se puede observar que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre el RCS de los animales pertenecientes al GV con respecto al RCS del GNV. A diferencia de lo esperado, los valores de este parámetro son muy aproximados para cada grupo en el tiempo 60 post-parto. Sin embargo, un trabajo realizado por Richardet y col., (2013) en donde se llevó a cabo un análisis de medidas repetidas para todos los tiempos de muestreo del ensayo de vacunación, se observó que existe diferencia significativa mayor en el GNV con respecto al GV. Esto indicaría que los animales vacunados con la cepa RC122 presentarían un estado saludable a diferencia de los animales del GNV.

**Tabla 7.** Logaritmo de las medias de RCS obtenidos para vacas y vaquillonas del Grupo Vacunados y del Grupo No Vacunados. P-valor obtenido al realizar el análisis estadístico ANOVA.

GRUPO	N° de animales	Media	p -valor
Vacunados	48	4,62548029	0,96997017
No Vacunados	46	4,63424669	

### Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó la efectividad de una vacuna en condiciones naturales de infección a campo en un establecimiento lechero de la cuenca de Villa María, Córdoba. El plan de vacunación evaluado consistió en tres dosis subcutáneas de la cepa avirulenta *S. aureus* RC122 90, 60 y 10 días antes del parto.

Los resultados obtenidos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

1. La vacunación permite obtener niveles significativos de anticuerpos en sangre de animales vacunados con respecto a animales no vacunados, luego de la administración de cada una de las dosis.
2. El mayor nivel de anticuerpos medido en todos los análisis se observó al momento del parto, período de máxima susceptibilidad a la mastitis.
3. Los anticuerpos (IgG) obtenidos luego de la vacunación son capaces de transportarse específicamente desde la sangre a la leche, otorgando protección a la glándula mamaria luego del parto.
4. La vacunación con la cepa RC122 permite recuperar los niveles de anticuerpos en sangre alcanzados en el periparto, luego de la disminución observada debido al estrés fisiológico y metabólico que se da en ese período.
5. Se puede apreciar la capacidad como inmunógeno que presenta la vacuna al demostrar que la misma desencadena la producción de anticuerpos opsónicos en sangre de animales inoculados que se unen a cepas homólogas y heterólogas pertenecientes a la Familia *Staphylococaceae*.
6. Si bien no se observó diferencia significativa en el RCS entre el GV y el GNV, la inoculación de tres dosis subcutáneas antes del parto permiten dar a los animales vacunados un mejor estado sanitario en comparación con los animales no vacunados, mediante un aumento en la producción de leche y una disminución en el aislamiento de microorganismos patógenos pertenecientes a la Familia *Staphylococaceae*

- Abera, M., Habte, T., Aragaw, K., Asmare, K. and Sheferaw, D. 2012. Major causes of mastitis and associated risk factors in smallholder dairy farms in and around Hawassa, Southern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod*, 44: 1175-1179.
- Alnakip, M., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I., Caamaño-Antelo, S., Calomata, P. y Barros-Velázquez, J. 2014. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *J. Vet. Med.* Volume 2014, Article ID 659801. Review.
- Anderson, K., Smith, A., Shanks, R., Whitmore, H., Davis, L. and Gustafsson, B. 1986. Endotoxin induced bovine mastitis: immunoglobulins, phagocytosis and effect of flunixin meglumine. *J. Vet. Res.* 47:2405.
- Bastida-Corcvera, K. 1992. The enhancement of mammary gland immunity through vaccination. In: *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. Andrews, A., Blowey, R., Boyd, H., and Eddy, A, Editors. Blackwell Sci. Publ., Cambridge, MA. p.135
- Bedolla, C. and Ponce de León, M. 2008. Economic causalities inflicted by the bovine mastitis in the milk industry. *REDVET.* 9(4):1695-7504.
- Besser, T. and Gay, C. 1994. The Importance of Colostrum to the Health of the Neonatal Calf. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 10(1):107-117
- Bogni, C., Segura, M., Giraudo, J., Giraudo, A., Calzolari, A. and Nagel, R. 1998. Avirulence and Immunogenicity in mice of a Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Mutant. *J. Vet. Res.* 62:293-298.
- Bonetto, C. (2013). Mastitis bovina causada por *Staphylococcus coagulasa* negativos. Tesis Doctoral. La Plata.
- Brandan, N., Aquino Esperanza, J., Codutti, A. Respuesta Inmunitaria. 2007. <http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/inmunitaria.pdf> (Consultado Agosto 2015)
- Caffin, J. and Poutrel, B. 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 71(8):2035-2043.
- Callejo Ramos, A. Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño. [http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema\\_1.\\_Anatomia\\_y\\_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno](http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia/breve-introduccion-a-la-anatomia-de-la-ubre-y-a-la-fisiologia-del-ordeno) (Consultado Febrero 2015)
- Calvino, L. F. and Tirante, L. I. 2005. Prevalence of bovine mastitis pathogens and changes in health status of the mammary gland in Argentina in the last 25 years. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*, 4: 1-12.

- Calvino, L.F. y Tarabla, H.D. 1997. Bases racionales para el tratamiento antibiótico de mastitis. En: Temas de Producción Lechera. Pub. Misc. N°84. EEA INTA Rafaela. Pp. 97-106.
- Calzolari, A., Giraud, J.A., Rampone, H., Odierno, L., Giraud, A.T., Frigerio, C., Bettera, S., Raspanti, C., Hernandez, J., Wehbe, M., Mattea, M., Ferrari, M., Larriestra, A., Nagel, R. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. J. Dairy Sci. 5, 854–858
- Campbell, J. A., Molino, H. C., Linari, J. J., García, P., Bohner, T., Curiotti, A., Depino, R., Felippa, E., Maritano, E., Magnasco, A. J., Taverna, M. A., Bauducco, V., Cappellini, O., Roulet, N. E., Gonzalez, E., Aranguren, R.; Anuario de Lecheria Funpel. 2013.
- 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. 4, 1177– 1193.
- Chabalgoity, J., Baz, A., Rial, A. and Grille, S. 2007. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. Cytokine & Growth Factor Reviews. 18:195–207
- Chang, B.S., Moon, J.S., Kang, H.M., Kim, Y.I., Lee, H.K., Kim, J.D., Lee, B.S., Koo, C., Park, Y.H. 2008. Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. Vaccine 17, 2081–2091.
- Collins, N.A., Moses, M., Moneoang, S.M., Corneleus, B. 2010. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa. South Afr J Sci 106: 1-6.
- Comline, R.S., Hall, L.W., Lavelle, R.B., Nathanielz, P.W., Silver, M. 1974. Parturition in the cow: endocrine changes in animals with chronically implanted catheters in the foetal and maternal circulations. J. Endocrinol. 63: 451–472.comparison of live and killed vaccines. Austr. Vet. J. 54:374-378.
- COMUNIV. 2006. Capítulo II. Informe de capacitación técnico empresarial en leche. (Consultado Junio 2015)
- Craven, N. and Anderson, J. 1984. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. J Dairy Sci. 51:513-523.
- Craven, N. and Williams, M.R. 1985. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. Vet. Immunol. Immunop. 10: 71-127.
- CULTEK. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf> (Consultado Junio 2015)

- Dairy Australia (2011) Dairy Australia Strategic Plan 2011-2015. <http://www.dairyaustralia.com.au/> (Consultado Junio 2015)
- Delouis, C. and Richard, P. 1991. Lactation. In: Reproduction in mammals and man. Thibault and M. Levasseur, Editors. INRA. Paris. p.487-514.
- Denis M., Parlane N. A., Lacy-Hulbert S. J., Summers E. L., Buddle B. M., Wedlock D. N.. 2006. "Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows," Vet. Immunol. Immunop., vol. 114, no.1-2, pp.111–120.
- Derosa, D.C., Sordillo, L.M. 1997. Efficacy of a bovine *Staphylococcus aureus* vaccine using interleukin-2 as an adjuvant. J. Vet. Med. B 44, 599–607.
- Dieser S., Vissio C., Lasagno M. C., Bogni C. I., Larriestra A. J. Odierno L. M. 2013. Prevalence of Pathogens Causing Subclinical Mastitis in Argentinean Dairy Herds. Pak Vet J, 34(1): 124-126.
- Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencia en la salud pública. FAO Producción y Sanidad Animal. 162:1-61.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2007. Anuario de producción <http://apps.fao.org/> (Consultado en Febrero 2015).
- Fox, P.F. and Kelly, A.L., 2006. "Indigenous enzymes in milk: over view and historical aspects part1," Int Dairy J, vol. 16, no.6, pp.500–516.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Reuelto, M., DeGregorio, O. 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J. Dairy Sci. 83:1224–1227.
- Giraud, J., Calzolari, A., Rampone, H., Giraud, A., Bogni, C., Larriestra, A., Nagel, R. 1997. Field trials of a vaccine against Bovine Mastitis. I. Evaluation in Heifers. J. Dairy Sci. 80:845-853
- Gomez, M., Sordelli, D., Buzzola, F., García, V. 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):4254-4260
- Guidry, A., Berning, L., Hambleton, C. 1993. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by Bovine Immunoglobulin Isotypes. J. Dairy Sci. 76:1285-1289.
- Guidry, A., Paape, R., Pearson, M. 1980a. Quarter milk variation in immunoglobulins and ability to support phagocytosis. J. Dairy Sci. 63:611.
- Guidry, A., Pearson, R., Paape, M., Williams, W. 1980b. Relationship among leukocyte phagocytosis, milk immunoglobulins and susceptibility to intramammary infection. Am. J. Vet. Res. 41:997.

- Haltia, L., Honkanen-Buzalski, T., Spiridonova, I., Olkonen, A., Mylly, V. 2006. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Vet Scand*, 48: 22-28.
- Hässig, A., Kremer, H., Wen- Xi, L., Stampfli, K. Patogénesis de la inmunosupresión en enfermedades hipercatabólicas (SIDA, sepsis, síndrome de shock tóxico, PCM). <http://www.free-news.org/hassig01.htm> (Consultado Agosto 2015)
- Hoedemaker, M., Korff, B., Edler, B., Emmert, M., Bleckmann, E. 2001. Dynamics of *Staphylococcus aureus* infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. *J. Vet. Med. B* 5, 373–383.
- Hogan, J., Bogacz, V., Aslam, M., Smith, K. 1999. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 bacterin administered to primigravid heifers. *J. Dairy Sci.* 82:939–943.
- Hogan, J.S.; Weiss, W.P.; Smith, K.L.; Todhunter, D.A.; Schoenberger, P.S.; Sordillo, L.M. 1995. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 2: 285-290.
- Hogeveen, H., Pyorala, S., Waller, K.P., Hogan, J.S., Lam, T. J.G. M. 2011. Current status and future challenges in mastitis research. NMC Annual Meeting Proceedings.
- Hu, S., Concha, C., Lin, F., Persson Waller, K. 2003. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunization against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 29–37.
- Kalmus, P., Aasmäe, B., Kärssin, A., Orro and Kask, K. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand*, 53: 4.
- Kehrlí, M.E. Jr.; Kimura, K.; Goff, J.P.; Stabel, J.R.; Nonnecke, B.J. 1998. Periparturient immunosuppression in dairy cows: nutrition and lactation effects. *Production Diseases in Farm Animals. 10th International Conference.* Ed. Th. Wensing. The Netherland.
- Kennedy, J., Watson, D., Bennell, M. 1981. The early phase of the immune response to live and killed *Staphylococcus aureus* vaccines in sheep-cellular and immunoglobulin parameters. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2:367-380
- Kimura, K.; Goff, J.P.; Nonnecke, B.J.; Horst, R.L.; Kehrlí Jr., M.E. 1998. Effect of mastectomy on steroid hormone, energy status and lymphocyte function in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81 (Suppl. 1): 43.
- Knight, C. 1991. Mammary gland biology. *Flem. Vet. J.* 64: 33-41
- Korhonen, H. and Pihlanto, A., 2007 “Bioactive peptides from food proteins,” in *Hand book of Food Products Manufacturing: Health, Meat, Milk, Poultry, Seafood, and Vegetables*, Y.Hui, Ed., pp.5– 38, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Lee, J.W., O'Brien, C.N., Guidry, A.J., Paape, M.J., Shafer-Weaver, K.A., Zhao, X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte

subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can. J. Vet. Res.* 1, 11–18.

- Leitner, G., Lubashevsky, E., Glickman, A., Winkler, M., Sarana, A., Trainin, Z. 2003a. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1–2, 31–38.
- Leitner, G.; Lubashevsky, D.; Nachmeas, E.; Glickman, A.; Winkler, M.; Saran, A.; Trainin, Z. 2000. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows: animal model, field trials and therapeutic effect. In: Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland, IDF, June 11–14, Stresa, Italy. p. 418-425.
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D., Galton, D., Rudan, M., Boor, K. F. 1999. Effects of somatic cell count of quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 83:264-274.
- Mackie, D. and Logan, E. 1986. Changes in immunoglobulin levels in whey during experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Res Vet Sci.* 40(2):183-8
- Mata, H.T.; Corbellini, C.N.; Pechin, G.H.; Larrea, A.T.; Otrosky, R.N.; Meglia, G.E. 2002. Evaluación de la Efectividad de una Vacuna contra Mastitis por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* en Vacas Lecheras. *Ciencia Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.Pam.* <http://www.biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/revet/n04a02mata.pdf> (Consultado Junio 2015)
- McDougall, S., Parker, K., Heuer, C., Compton, C. 2009. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. Review article. *Vet. Microbiol.* 134:177–185. Review
- Meglia, G. E. 2000. The influence of nutrient intake on the immune defence of the dairy cow with emphasis on the periparturient period. MSc. Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Meglia, G.E.; Mata, H.T. 2001. Mecanismos específicos e inespecíficos de defensa, con referencia a la glándula mamaria de los bovinos productores de leche. [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/infeciosas/bovinos\\_leche/10- Inmunidad\\_en\\_glandula\\_mamaria.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/10- Inmunidad_en_glandula_mamaria.pdf) (Consultado Junio 2015)
- Middleton, J.R. 2008. *Staphylococcus aureus*, antigens and challenges in vaccine development. *Expert Rev. Vaccine* 6, 805–815.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina, 2015. <http://www.minagri.gob.ar>. (Consultado Febrero 2015)
- Musser, J.M.; Anderson, K.L. 1996. Effect of vaccination with *Escherichia coli* bacterin-toxoid on milk production in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 7: 1291-1293.

- Nam, H.M., Kim, J.M., Lim, S.K., Jang, K.C., Jung S.C. 2010. Infectious a etiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008. *Res Vet Sci*, 88: 372-374.
- National Mastitis Council (NMC). 2003. *Current Concepts of Bovine Mastitis*. 4<sup>th</sup> ed. Madison, WI: National Mastitis Council Publications.
- National Mastitis Council, 1999. *National Mastitis Council Publication "Laboratory Handbook on Bovine Mastitis"* (1999) pg. 147-149. <http://www.nmconline.org/articles/bacillus.htm> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2001 *NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis"* (1999) pg. 151. <http://www.nmconline.org/articles/mycoplnotes.htm> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2001 *NMC publication "Laboratory Handbook on Bovine Mastitis"* pg. 111 (1999) <http://www.nmconline.org/articles/pastrla.htm> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2003 NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis" (1999) pg. 139. <http://www.nmconline.org/articles/arcanobnotes.htm> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2004 *NMC Publication "Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis"* (1999) pg. 135 <http://www.nmconline.org/articles/cbovisnotes.htm> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2011 *NMC publication "Laboratory Handbook on Bovine Mastitis"* pg. 99 (1999) <http://www.nmconline.org/articles/serrnotes.htm> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2011 Preguntas sobre calidad de la leche. Questions about milk quality. ¿Cuál es la diferencia entre mastitis contagiosa y mastitis ambiental y por qué es importante? *El Lechero* Mayo 2011. <http://www.nmconline.org/transl/elLecheroContEnv.pdf>. (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2012 <http://www.progressivedairy.com/el-lechero/espanol/temas-basicos/salud-del-hato/9770-preguntas-sobre-calidad-de-la-leche-como-se-desarrolla-la-mastitis-en-la-ubre> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council, 2013. ¿Cuál es la diferencia entre mastitis clínica y subclínica? Preguntas sobre calidad de la leche. *El Lechero* Mayo 2013 (14). <http://nmconline.org/transl/ellecheroClinicalSubcl.pdf> (Consultado Mayo 2015)
- National Mastitis Council. [http://www.nmconline.org/transl/contagmast\\_sp.pdf](http://www.nmconline.org/transl/contagmast_sp.pdf) (Consultado Junio 2015)

- Nickerson, S. and Heald, C. 1981. Hystopathology Response of the Bovine Mammary Gland to Experimental Induced *Staphylococcus aureus* Infection. Am. J. of Vet. Res. 42(8):1351- 1355.
- Nickerson, S.C., Owens, W.E., Boddie, R.L., 1993. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection, and mammary histology in nonlactating dairy cows. J. Dairy Sci. 5, 1290– 1297.
- Nordhaug, M.L., Nesse, L.L., Norcross, N.L., Gudding, R., 1994a. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. J. Dairy Sci. 5, 1267–1275.
- O'Brien, C., Guidry, A., Douglass, L. and Westhoff, D. 2001. Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. J. Dairy Sci. 84(8):1791 1799
- 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) microspheres1. J. Dairy Sci. 8, 1758–1766.
- Paape, M., Shafer-Weaver, K., Capuco, A., Van Oostveldt, K. and Burvenich, C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. Adv. Exp. Med. Biol. 480:259– 277
- 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 3: 726-731.
- Pellegrino. 2010. Mastitis bovina: Ensayos experimentales de vacunación en bovinos con la cepa *S. aureus* RC122 para su estudio en la prevención de la enfermedad. Tesis Doctoral.
- Pellegrino 2011. Mastitis bovina: Ensayos experimentales de vacunación en bovinos con la cepa *S. aureus* RC122 para su estudio en la prevención de la enfermedad. LAMBERT Academics Publishing GmbH & Co. ISBN: 978-38454-9520-0
- Pellegrino M., Giraudó J., Raspanti C., Odierno L., Bogni C., 2010, Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine . Vaccine 28 (2010) 4523–4528.
- Pellegrino, M., Giraudó, 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. Vet. Microbiol. 1–2, 186–190.
- Pereira U.P., Oliveira D.G.S, Mesquita , L.R. Costa G.M., Pereira L.J. 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. Vet. Microbiol 148 117–124. Review.

- Pereyra E A.L., Dallarda B E. Calvinho L F. 2014. Aspectos de la respuesta inmune innata en las infecciones intramamarias causadas por *Staphylococcus aureus* en bovinos. Rev Argent Microbiol; 46(4):363-375.
- Pöhlmann-Dietze, P., Ulrich, M., Kiser, K.B., Döring, G., Lee, J.C., Fournier, J.M., Botzenhart, K., Wolz, C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. Infect Immun; 68:48 65-71.
- Porcherie, A., Cunha, P., Trotereau, A., 2012. "Repertoire of Escherichia coli agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells," Vet. Res., vol. 43, article 14.
- Prenafeta, A., March, R., Foix, A., Casals, I., Costa, L., 2010. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 134, 208–217.
- Quigley, J. 1998. Colostrum Feeding - How much is Enough? American Protein Corporation. [www.americanprotein.com/calf /calfnotes](http://www.americanprotein.com/calf/calfnotes).
- Reinoso, E., Magnano, G., Giraud, J., Calzolari, A. and Bogni, C. 2002. Bovine and rabbit models for study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant RC122. Can. J. Vet. 66(4):285-288.
- Richardet y col., 2013. 7th Vaccine and ISV congress. 26-29 octubre. Sitges, Barcelona, España. Field trials of *Staphylococcus aureus* avirulent vaccine against bovine mastitis under natural infection in dairy farm. Richardet M., Vissio C., Pellegrino M., Larriestra A., Lasagno M., Giraud J., Raspanti C., Odierno L., Bogni C.
- Riollet, C., Rainard P., Poutrel B. 2000. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. Adv Exp Med Biol.480:247-58.
- Saidi R., Khelefand, D., Kaidi, R. 2013. Subclinical mastitis in cattle in Algeria: Frequency of occurrence and bacteriological isolates. J S Afr Vet Assoc, 84: E1-5.
- Sandholm, M.; Honkanen-Buzalski, T.; Kaartinen, L. and Pjörälä, S. 1995. The Bovine Udder and Mastitis. Finland: Gummerus Kirjapaino Publications
- Schmidt, G. 1974. Lactation Biology. Spain: Freeman & Co. Ltd. Publications
- Schwarse, E. and Schroider, L. 1984. Compendio de Anatomía Veterinaria. Acribia, Zaragoza, España.
- Seki, K., Okasawara, M., Sakurada, J., Maurai, M. and Masura, S. 1987. Altered virulence of a pleiotropic *Staphylococcus aureus* mutant with low producibility of coagulase and others factors in mice. Inmul. 33(12):981-990.

- 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 cows. *Vaccine* 1, 114–126.
- Singh, K., Davis, S. R., Dobson, J. M. 2008, “cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland,” *J. Dairy Sci.*, vol.91, no.6, pp.2236–2246.
- Smith, V.R. *Physiology of lactation*. University Press: Iowa State, 1968.
- Smith, K. and Hogan, J. 1997. *Epidemiology of Mastitis*. Proc. 3rd International Mastitis Seminar, Tel Aviv, Israel. p.3-12.
- Smith, V.G.; Edgerton, L.A.; Hafs, H.D.; Convey, E.M. 1973. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation. *J. Anim. Sci.* 36: 391–396.
- Sordelli, D., Iglesias, M., Cerquetti, M., Catalano, M., Hooke, A. 1993. Temperature-Sensitive Mutant of *Staphylococcus aureus*: Isolation and Preliminary Characterization. *Current Microbiol.* 27(3):125-129.
- Sordillo, L. and Streicher, K. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 7:135-146
- Sordillo, L. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Review article. *Livest. Prod. Sci.* 98:89–99.
- Sordillo, L. and Nickerson, N. 1988. Quantification and immunoglobulin classification of plasma cells in nonlactating bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 71:84.
- Sordillo, L., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. Review article. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865
- Stelwagen, K., Carpentier, E. R., Haigh, B., Hodgkinson, A., and Wheeler, T.T., 2009 “Immune components of bovine colostrum and milk,” *J. Anim. Sci.*, vol. 87, no.13, pp.3 9.
- Sudhan, N. and Sharma, N. 2010. “Mastitis-an important production disease of dairy animals,” in Gurgaon: Sarva Manav Vikash Samiti, pp.72–88.
- Sutra, L., and B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89.
- Targowski, S.P.; Klucinski, W. 1983. Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. *Am. J. Vet. Res.* 44: 828–830.
- Targowski, S.P.; Klucinski, W.; Travis Littledike, E.; Hoy, D.A. 1985. Suppression of mitogenic response of bovine lymphocytes during experimental ketosis in calves. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1378–1380.

- Tellez y Romero. Anatomía y Fisiología de la glándula mamaria [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_bovina\\_de\\_leche/produccion\\_bovina\\_leche/110-anatomia.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_bovina_de_leche/produccion_bovina_leche/110-anatomia.pdf) (Consultado mayo 2015)
- Ten Napel, J., Haas, Y., De Jong, G., Lam, T. J. G. M., Ouweltjes W., and Windig J. J. 2009. "Characterization of distributions of somatic cell counts," J. Dairy Sci. Vol. 92, no. 3, pp.1253–1264.
- Tenhagen, A., Edinger, D., Baumgartner, B., Kalbe, P., Klunder, G., Heuwieser, W., 2001. Efficacy of a herd-specific vaccine against *Staphylococcus aureus* to prevent post-partum mastitis in dairy heifers. J.Vet. Med. A: Physiol. Pathol. Clin. Med. 10, 601–607.
- Tiwari, J., Babra, C, Tiwari, H., Williams, V., De Wet, S., Gibson, J., Paxman, A., Morgan, E., Costantino, P., Sunagar, R., Isloor, S., and Mukkur, T. 2013. Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview. Vaccines Vaccin, 4:1. Review.
- Todar, K. Todar's online textbook of bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>. (Consultado Mayo 2015)
- UN-Comtrade. <http://comtrade.un.org/> (Consultado Febrero 2015)
- Verbeet, M., Vermeer, H., Warmerdam, G., de Boer, H., Lee, S. 1995. Cloning and characterization of the bovine polymeric immunoglobulin receptor-encoding cDNA. Gene. 164(2):329-33.
- Watson, D. L. 1992. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. Res. Vet. Sci. 3, 346-353.
- Watson, D. L. Davies, H. L. 1993. Influence of adjuvants on the immune response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. Vet. Microbiol. 2, 139-153.
- Watson, D. L. and Lee, C. 1978. Immunity to experimental staphylococcal mastitis-comparison of live and killed vaccines. Austr. Vet. J. 54:374-378.
- Watson, D.L., Mccoll, M.L., Davies,H.I., 1996. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. Aust. Vet. J. 6, 447–450.
- Whelehan, C. J., Meade, K. G., Eckersall, P. D., Young, F. J and O'Farrelly, C., 2011. "Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression," Vet. Immunol. Immunop., vol. 140, no.3-4,pp.181–189.
- White, D.G., McDermott, P.F. 2001. Emergence and transfer of antibiotic resistance. J Dairy Sci 84: E151-E5.
- Yancey, R., Sanchez, M., Ford, W. 1991. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* with in polymorphonuclear neutrophils. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10:107-113.

## Bibliografía

---

- Yoshida, K., Ichiman, Y., Narikawa, S., 1984. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. *J. Dairy Sci.* 3, 620–627.