

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**“Desarrollo de un inmunógeno prototípico para el control  
de mastitis bovinas causadas por *Staphylococcus aureus*”**

*Autora: Cecilia M. Camussone*

*Director: PhD. Luis F. Calvino*

*Co-Director: Dr. Iván S. Marcipar*

Área de Investigación en Producción Animal.

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. INTA.



*“Hemos de esforzarnos para mejorarnos individualmente pero entendiendo que formamos parte de una sociedad que demanda nuestra participación. Cuanto más destacada sea nuestra posición individual más grande será nuestro compromiso social. Ha llegado la hora de trabajar con humildad y modestia verdaderas. Hay que aprender a no marearse con las alturas de la montaña. En la montaña de la vida nunca se alcanza la cumbre”.*

René Favalaro. Don Pedro y la educación.

Centro Editor de la Fundación Favalaro, Buenos Aires, 1994.

***A mis padres...***

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. CONSIDERACIONES GENERALES</b> .....	<b>7</b>
I.1. INTRODUCCIÓN.....	7
I.1.1. Mastitis bovina.....	7
I.1.1.1. Formas de mastitis .....	7
I.1.1.2. Mastitis en vaquillonas .....	8
I.1.1.3. Impacto económico .....	9
I.1.2. Mastitis por <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
I.1.2.1. Patogénesis de mastitis por <i>S. aureus</i> .....	10
I.1.2.2. Contaminación del pezón .....	10
I.1.2.3. Factores de virulencia. ....	11
I.1.3. Inmunología de la glándula mamaria.....	21
I.1.3.1. Mecanismos de defensa.....	21
I.1.4. Control .....	35
I.1.5. Vacunas .....	36
I.1.5.1. Vacunas comerciales.....	36
I.1.5.2. Adyuvantes .....	38
I.2. OBJETIVOS.....	42
<b>CAPÍTULO II. ENSAYO I DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS: EVALUACIÓN DE ADYUVANTES</b> .....	<b>43</b>
II.1. MARCO TEÓRICO.....	43
II. 2. OBJETIVOS .....	45
II.3. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	46
II.3.1. Inmunización y Muestreo .....	46
II.3.1.1. Cepas de <i>S. aureus</i> .....	46
II.3.1.2. Preparación de bacterina de <i>S. aureus</i> .....	46
II.3.1.3. Formulación de las vacunas .....	46
II.3.1.4. Animales .....	47
II.3.1.5. Inmunización y muestreo.....	47
II.3.1.6. Análisis bacteriológico de muestras de leche .....	48
II.3.2. Obtención del Polisacárido Capsular Tipo 5 de <i>S. aureus</i> . ....	49
II.3.3. Evaluación de la respuesta inmune humoral .....	50
II.3.3.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) .....	50
II.3.3.2. Ensayos de fagocitosis .....	51
II.3.4. Evaluación del perfil de citoquinas en animales inmunizados.....	53
II.3.4.1. Toma de muestras .....	53
II.3.4.2. Extracción de ARN total .....	53

II.3.4.3. Transcripción reversa del ARN .....	54
II.3.4.4. PCR en Tiempo Real .....	54
II.4. RESULTADOS .....	56
II.4.1. Respuesta de anticuerpos en sangre .....	56
II.4.2. Respuesta de anticuerpos en leche .....	59
II.4.3. Oponización y fagocitosis por neutrófilos bovinos .....	60
II.4.4. Expresión de citoquinas .....	62
II.5. DISCUSIÓN .....	65
<b>CAPÍTULO III: OBTENCIÓN DE ANTIGENOS RECOMBINANTES DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>69</b>
III.1. MARCO TEÓRICO.....	69
III. 2. OBJETIVOS .....	71
III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
III.3.1. Obtención de los antígenos recombinantes $\beta$ -toxina, FnBP-A y ClfA de <i>S. aureus</i> .....	72
III.3.1.1. Obtención del fragmento codificante para la $\beta$ -toxina de <i>S. aureus</i> .....	72
III.3.1.2. Obtención de los clones recombinantes de $\beta$ -toxina .....	74
III.3.1.3. Obtención de las proteínas recombinantes .....	77
III.3.2 Obtención de la $\beta$ -toxina nativa de <i>S. aureus</i> . .....	79
III.3.3. Evaluación de la actividad hemolítica de las toxinas purificadas.....	79
III.4. RESULTADOS .....	80
III.4.1. Obtención de la $\beta$ -toxina recombinante (rBT) .....	80
III.4.2. Obtención de los antígenos FnBP-A y ClfA recombinantes.....	83
III.4.3. Obtención de la $\beta$ -toxina nativa (nBT) .....	84
III.5. DISCUSIÓN .....	86
<b>CAPÍTULO IV.    ENSAYO II DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS: COMPARACIÓN DE INMUNÓGENOS BASADOS EN CÉLULAS ENTERAS O LISADAS DE <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>89</b>
IV.1. MARCO TEÓRICO .....	89
IV.2. OBJETIVOS.....	91
IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	92
IV.3. 1. Inmunización y Muestreo .....	92
IV.3.1.1. Preparación de bacterina de <i>S. aureus</i> .....	92
IV.3.1.2. Preparación de lisado de <i>S. aureus</i> .....	92
IV.3.1.3. Formulación de las vacunas.....	92
IV.3.1.4. Animales .....	92
IV.3.1.5. Inmunización y muestreo .....	93
IV.3.1.6. Análisis bacteriológico de muestras de leche .....	94
IV.3.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	94
IV.3.2.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	94
IV.3.2.2. Ensayos de fagocitosis .....	95
IV.3.2.3. Ensayos de inhibición de la internalización de <i>S. aureus</i> en células epiteliales mamarias bovinas.....	95
IV.3.3. Evaluación del perfil de citoquinas en animales inmunizados .....	96

IV.4. RESULTADOS.....	97
IV.4.1. Respuesta de anticuerpos en sangre.....	97
IV.4.2. Respuesta de anticuerpos en leche.....	101
IV.4.3. Respuesta de anticuerpos frente a una dosis refuerzo de los inmunógenos experimentales.....	103
IV.4.4. Oponización y fagocitosis por neutrófilos bovinos.....	105
IV.4.5. Inhibición de la internalización en células epiteliales mamarias.....	107
IV.4.6. Expresión de citoquinas.....	108
IV.5. DISCUSIÓN.....	110

**CAPÍTULO V: ENSAYO III DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS: INCORPORACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES AL LISADO DE *S. aureus*..... 115**

V.1. MARCO TEÓRICO.....	115
V.2. OBJETIVOS.....	118
V.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
V.3.1. Inmunización y Muestreo.....	119
V.3.1.1. Preparación de lisado de <i>S. aureus</i> .....	119
V.3.1.2. Antígenos recombinantes.....	119
V.3.1.3. Formulación de las vacunas.....	119
V.3.1.4. Animales.....	120
V.3.1.5. Inmunización y muestreo.....	120
V.3.1.6. Análisis bacteriológico de muestras de leche.....	121
V.3.2. Evaluación de la respuesta inmune humoral.....	122
V.3.2.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	122
V.3.2.2. Western Blot (WB).....	122
V.3.2.3. Ensayos de fagocitosis.....	123
V.3.2.4. Inhibición de actividad hemolítica.....	123
V.3.3. Evaluación de la respuesta inmune celular.....	123
V.3.3.1. Linfoproliferación <i>in vitro</i> .....	123
V.3.4. Diagnóstico de IIM. Caracterización de las cepas de <i>S. aureus</i> .....	125
V.3.4.1. Caracterización molecular.....	125
V.3.4.2. Caracterización fenotípica. Análisis de la expresión <i>in vitro</i> de hemolisinas.....	127
V.4. RESULTADOS.....	128
V.4.1. Respuesta de anticuerpos en sangre.....	128
V.4.2. Respuesta de anticuerpos en leche.....	130
V.4.3. Oponización y fagocitosis por neutrófilos bovinos.....	132
V.4.4. Reconocimiento y neutralización de la actividad de $\beta$ -toxina nativa de <i>S. aureus</i> .....	133
V.4.5. Evaluación de la respuesta inmune celular.....	136
V.4.6. Caracterización de <i>S. aureus</i> aislados de IIM.....	137
V.5. DISCUSIÓN.....	139

**CONCLUSIONES..... 145**

<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>146</b>
<b>APÉNDICE I: SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>163</b>
<b>APÉNDICE II: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE <math>\beta</math>-TOXINA .....</b>	<b>169</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>171</b>

## ABREVIATURAS

<b>Abs.</b>	absorbancia
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ácido desoxirribonucleico copia
<b>APC</b>	célula presentadora de antígeno
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>ASB</b>	albúmina sérica bovina
<b>pb</b>	pares de bases
<b>C3b</b>	factor C3b de complemento
<b>C1f</b>	factor de agregación
<b>CP</b>	polisacárido capsular
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b>	desoxinucleótidos trifosfato
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
<b>ER</b>	expresión relativa
<b>Fab</b>	fragmento de unión al antígeno
<b>Fc</b>	fragmento cristizable
<b>FITC</b>	isotiocianato de fluoresceína
<b>Fn</b>	fibronectina
<b>FnBP</b>	proteína de unión a fibronectina
<b>GR</b>	glóbulos rojos
<b>Ig</b>	inmunoglobulina
<b>IIM</b>	infección intra-mamaria
<b>IL</b>	interleuquina
<b>IMF</b>	intensidad media de fluorescencia
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -d-tiogalactopiranosido
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>MHC</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>NK</b>	<i>natural killer</i>
<b>ON</b>	<i>over night</i> (toda la noche)

<b>OVA</b>	ovoalbúmina
<b>PAMP</b>	patrón molecular asociado a patógenos
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PM</b>	peso molecular
<b>PMN</b>	neutrófilo polimorfonuclear
<b>PMSF</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>RCS</b>	recuento de células somáticas
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>SAAC</b>	complejo antigénico asociado a <i>slime</i>
<b>SD</b>	desviación estándar
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>TA</b>	temperatura ambiente
<b>TAE</b>	solución tampón tris-acético-EDTA
<b>TCR</b>	receptor de células T
<b>TMR</b>	ración totalmente mezclada
<b>U</b>	unidad de actividad enzimática
<b>Ufc</b>	unidad formadora de colonias
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>V</b>	volts
<b>W</b>	watts
<b>Xgal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -d-galactopiranosido

## RESUMEN

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que causa las mayores pérdidas económicas, tanto al productor como a la industria lechera. Si bien puede ser causada por varios agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis en Argentina y en otros países de gran desarrollo lechero. *S. aureus* posee la habilidad de invadir tejidos y sobrevivir intracelularmente, lo cual lo protegería de la respuesta inmune humoral del huésped y el tratamiento con antibióticos. Estas particulares características patogénicas de *S. aureus* determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y curativas tradicionales, tendiendo a producir infecciones crónicas, que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario. Por consiguiente, se han propuesto medidas alternativas que permitan una mayor reducción de la prevalencia de mastitis, tendiendo a un menor uso de antimicrobianos. Una de ellas es la manipulación de los mecanismos de defensa específicos del hospedador a través del uso de inmunógenos. En las últimas décadas se han desarrollado diversas vacunas experimentales. Algunas de ellas, compuestas por bacterinas o lisados de cultivos de *S. aureus*, alcanzaron la fase de comercialización. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento con estos inmunógenos muestran un control parcial de la infección. Estas observaciones señalan la necesidad de explorar nuevas alternativas para mejorar el desempeño de las bacterinas actualmente disponibles. Se ha propuesto que, para una protección adecuada, la vía de administración del inmunógeno, así como el adyuvante utilizado en la formulación deberían inducir la producción de anticuerpos opsonicos y la estimulación de una respuesta celular con reclutamiento de neutrófilos activados. El adyuvante clásico utilizado internacionalmente en vacunas veterinarias es el  $Al(OH)_3$ . Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas adyuvantes, entre ellos, los complejos inmunoestimulantes como Iscom Matrix™. Los mismos están compuestos por saponinas, colesterol y fosfolípidos, y se han mostrado capaces de inducir respuestas humorales/celulares balanceadas. Si bien hay numerosos antecedentes del uso de estos complejos en la formulación de vacunas veterinarias, las mismas están en su mayoría compuestas por antígenos definidos, y no existe experiencia en su aplicación para la formulación de bacterias enteras o lisadas.

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un prototipo de vacuna contra mastitis bovinas causadas por *Staphylococcus aureus*. Para alcanzarlo, en una primera etapa se compararon las respuestas inmunes generadas en bovinos por bacterinas de *S. aureus* productoras de polisacárido capsular 5 (CP5), formuladas con un adyuvante tradicional,  $Al(OH)_3$ , o un adyuvante de nueva generación, Iscom Matrix™. Se inmunizaron vaquillonas

preñadas con 2 dosis de cada uno de los inmunógenos, y se evaluó la respuesta inmune innata y humoral específica, así como la funcionalidad de los anticuerpos generados. La formulación del inmunógeno experimental con Iscom Matrix™ potenció la respuesta inmune humoral a través de la producción de IgG específica en sangre y leche y un significativo incremento de los títulos de IgG<sub>2</sub> sanguíneos, lo cual se asoció con una mayor capacidad opsonica de los sueros. Sobre la base de estos resultados se seleccionó a Iscom Matrix™ como adyuvante para la formulación de los siguientes inmunógenos evaluados en este trabajo. Posteriormente, se compararon las respuestas inmunes generadas en vaquillonas preñadas por una bacterina y un lisado de *S. aureus* CP5 formulados con Iscom Matrix™. Luego de la aplicación de 2 dosis de los inmunógenos, se observaron en ambos grupos inmunizados potentes respuestas humorales específicas en sangre y leche, con anticuerpos capaces de favorecer la fagocitosis del microorganismo por PMN bovinos e inhibir su internalización en células epiteliales mamarias. Entre ellos, la formulación con lisado bacteriano fue la que mostró un mejor desempeño en cuanto a la producción de anticuerpos específicos e inducción temprana de la expresión de citoquinas con potencial importancia en el control de IIM por *S. aureus*. Sin embargo, no se observó la producción de anticuerpos dirigidos hacia componentes antigénicos superficiales de *S. aureus*, como la proteína de unión a fibronectina A (FnB P-A) y el clumping factor A (ClfA) o tóxicos, como la  $\beta$ -toxina, en ninguno de los animales inmunizados. Frente a estos resultados, se obtuvieron, por medio de tecnología de ADN recombinante, los antígenos de *S. aureus*  $\beta$ -toxina, FnBP-A y ClfA, cuyo rol en la patogenicidad del microorganismo y acción en diferentes etapas de la IIM han sido demostrados. En una última etapa del trabajo, los antígenos recombinantes se utilizaron para complementar una formulación basada en células lisadas de *S. aureus* CP5 y formulada con Iscom Matrix™. Como hipótesis, la respuesta inmune generada por este inmunógeno sería dirigida contra componentes que cumplan un rol determinante tanto en las primeras etapas de la interacción huésped-patógeno (FnBPA, ClfA), como en la evasión del sistema inmune (CP), y en etapas más avanzadas de la infección bacteriana ( $\beta$ -toxina) y que, debido a las características del adyuvante, permitiría la generación de una respuesta humoral-celular beneficiosa para el control de la infección. La inmunización de vaquillonas con 2 dosis del inmunógeno multicomponente potenció la respuesta de anticuerpos en sangre y leche dirigidos hacia los antígenos recombinantes. Los mismos resultaron eficientes en la opsonización del microorganismo y en la neutralización de la actividad de la  $\beta$ -toxina nativa de *S. aureus in vitro*, posicionando a estos componentes como buenos candidatos para ser incorporados en una formulación destinada a la inmunoprofilaxis de las IIM bovinas causadas por *S. aureus*.

## ABSTRACT

Bovine mastitis causes the greatest economical losses both to the producer and the dairy industry. *Staphylococcus aureus* is the most frequently isolated pathogen from bovine mastitis in Argentina and worldwide. *S. aureus* has the ability to invade tissues and survive intracellularly, gaining protection against the host immune response and antibiotic treatment. The peculiar pathogenic characteristics of *S. aureus* make it difficult to control through preventive and curative traditional measures, tending to originate chronic infections that lead, in many cases, to permanent tissue damage. Hence, other approaches to reduce *S. aureus* mastitis prevalence besides antibiotic usage and classical hygiene practices have been proposed. Among these alternatives, the manipulation of host defense mechanisms through vaccination has been explored. In the last decades, different experimental vaccines have been generated. Only few of them, composed by *S. aureus* bacterins or lysates, are commercially available; however, these vaccines do not uniformly prevent *S. aureus* intramammary infection (IMI). These observations pointed out the need to explore new alternatives to improve currently available vaccines. It has been proposed that to obtain a suitable protection, immunogen, administration route and adjuvant used for formulation should induce opsonic antibodies production and cellular immune response with activated neutrophil recruitment. Most veterinary vaccines are formulated with the classical adjuvant aluminum hydroxide  $Al(OH)_3$ . However, during the last years, new adjuvant systems, among them immune-stimulating complexes like Iscom Matrix™, have been developed. These complexes are composed by saponins, cholesterol and phospholipids and are able to produce balanced humoral/cellular responses. Even though numerous veterinary vaccines have been formulated with these complexes, these formulations have included defined antigens and there is no experience in the usage of these complexes with whole or lysed bacteria.

The aim of this study was to develop a prototype vaccine against *S. aureus* bovine mastitis. In a first stage, immune responses induced in heifers by *S. aureus* bacterins from a capsular polysaccharide 5 (CP5) producing strain, formulated either with  $Al(OH)_3$  or a new generation adjuvant, Iscom Matrix™, were compared. Pregnant heifers were immunized with 2 doses of each immunogen, and innate and specific humoral immune responses, as well as antibodies functionality were evaluated. Formulation of experimental immunogen with Iscom Matrix™ strengthened humoral response, through production of specific IgG in blood and milk, and a significant increase in IgG<sub>2</sub> serum titers, which was associated with an augmented opsonic capacity. Based on these results, Iscom Matrix™ was selected for the formulation of further immunogens evaluated in this study. In a second stage, immune responses generated in

pregnant heifers by either a *S. aureus* CP5 bacterin or lysate, formulated with Iscom Matrix™ were evaluated. After inoculation of two doses of immunogens, both immunized group developed potent specific humoral responses in blood and milk, generating antibodies that favoured *S. aureus* phagocytosis by bovine PMN and inhibited its internalization in bovine mammary epithelial cells. The bacterial lysate formulation showed a better performance regarding production of specific antibodies and induction of cytokines involved in early immune responses to the immunogen. However, no production of antibodies directed to selected *S. aureus* superficial antigens, like fibronectin binding protein A (FnBP-A) and clumping factor A (ClfA), or toxic proteins, like  $\beta$ -toxin, were detected in any immunized animal. Accordingly,  $\beta$ -toxin, FnBP-a and ClfA, whose role at different stages of infection has been demonstrated, were obtained by recombinant technology and used to complement a *S. aureus* CP5 lysate formulation, adjuvanted with Iscom Matrix™. Therefore, it was hypothesized that the immune response generated by the immunogen would be directed against bacterial components that have a relevant role in first stages of host-pathogen interaction (FnBPA and ClfA), in immune system evasion (CP) and in advanced stages of infection ( $\beta$ -toxin). In addition, the use of immune stimulating complexes would generate humoral/cellular responses beneficial for infection control. Heifers' immunization with 2 doses of the multicomponent immunogen strengthened antibody responses against recombinant antigens in blood and milk. These antibodies were efficient in opsonizing *S. aureus* and blocking native  $\beta$ -toxin hemolytic activity *in vitro*, positioning these molecules as good candidates to be incorporated in a formulation for *S. aureus* bovine mastitis immune prophylaxis.

## **CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. CONSIDERACIONES GENERALES**

### **I.1. INTRODUCCIÓN**

#### **I.1.1. MASTITIS BOVINA**

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria en respuesta a una agresión local al tejido mamario que puede ser de origen infeccioso, mecánico o tóxico. Sin embargo, la gran mayoría de los casos de mastitis son debidos a infecciones intra-mamarias (IIM) causadas por microorganismos, principalmente bacterias, que invaden la ubre, se desarrollan y generan productos tóxicos perjudiciales para el tejido mamario (Shalm y col., 1971). La mastitis es, una de las enfermedades más prevalentes y perjudiciales del ganado bovino lechero. Por otro lado, no solo afecta la economía de los productores sino también la imagen del sector lechero, debido a problemas relacionados con la calidad de la leche y la salud pública, a causa del riesgo de la presencia de residuos en leche por el inadecuado uso de antimicrobianos y a la potencial emergencia de bacterias resistentes (De vlieghe y col., 2012). Se la considera una enfermedad compleja, producto de la interacción de varios factores de riesgo:

Factores del huésped: presencia o ausencia de resistencia natural a mastitis, estado del sistema inmune del animal, estadio de lactancia, factores de stress.

Factores de los microorganismos infecciosos: número de microorganismos en la glándula, patogenicidad del microorganismo (relacionada con la capacidad de invadir la glándula mamaria, adherirse al tejido y multiplicarse), presencia de factores de virulencia del microorganismo.

Factores ambientales: diseño y funcionamiento de la máquina de ordeñar, prácticas de higiene, tipos de camas y alojamientos, condiciones climáticas.

##### **I.1.1.1. Formas de mastitis**

Cuando una bacteria invade la glándula mamaria a través del orificio del pezón puede establecerse una IIM, la cual provoca una respuesta inflamatoria: mastitis. La misma puede manifestarse de dos formas:

Mastitis clínica: presencia de signos visibles de la enfermedad, como secreción anormal de la leche, dolor, calor, enrojecimiento del cuarto o de la ubre en general; así como de signos sistémicos como fiebre o pérdida de apetito, que pueden en algunos casos conducir a la

muerte del animal (mastitis clínica superaguda).

Mastitis Subclínica: ausencia de sintomatología; solo puede ser detectada mediante métodos de diagnóstico indirectos (aumento del recuento de células somáticas, RCS) o microbiológicos (presencia de bacterias) de la leche. Este tipo de manifestación es la causante de las mayores pérdidas económicas de los establecimientos lecheros debido a la disminución de la producción de leche. Se estima que por cada caso de mastitis clínica existen entre 15 a 40 casos subclínicos (Shalm y col., 1971).



**Figura 1.** Vaca Holstein cursando mastitis clínica. Se observan signos clínicos como inflamación y enrojecimiento de la glándula mamaria. Fuente: EEA Rafaela. INTA.

#### **I.1.1.2. Mastitis en vaquillonas**

Si bien la mayoría de las IIM se producen durante la lactancia o los períodos no lactantes subsiguientes, también pueden afectar a las hembras bovinas tanto desde antes del comienzo de su vida reproductiva como durante la primera gestación. Muchas de estas infecciones, que pueden persistir por largos períodos, están asociadas a elevación del recuento de células somáticas (Hallberg y col., 1995) y presencia de signos clínicos (Myllys y Rautala, 1995; Nickerson y col., 1995), pudiendo perjudicar el desarrollo mamario y por lo tanto afectar la producción de leche luego del parto, acortando la vida útil del animal en el rodeo (Myllys y Rautala, 1995). La presencia de IIM al parto está altamente asociada a las prácticas de manejo de la ternera y la vaquillona; por lo tanto, estas prácticas son determinantes de la

aparición de IIM subclínicas y clínicas al periparto. Los programas de control de mastitis, deben consecuentemente, incluir medidas de manejo que eviten las potenciales fuentes de contagio y factores de riesgo. De esta forma, al minimizar la aparición de IIM en estas etapas tempranas, la vaquillona estará en condiciones de desarrollar todo su potencial productivo durante su primera lactancia.

### **I.1.1.3. Impacto económico**

Desde el punto de vista económico, la mastitis es la enfermedad más importante del ganado lechero. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad se deben principalmente a la disminución de la producción, el descarte de leche, el costo extra de medicamentos y de honorarios veterinarios y la eliminación prematura de animales (Saran y Chaffer, 2000).

El Consejo Nacional de Mastitis de EE.UU. (1996), estimó las pérdidas anuales por mastitis en U\$184 por animal, siendo la disminución en la producción de leche el factor principal, representando un 66% de la pérdida total. En Argentina, si bien no existen estadísticas actualizadas acerca de las pérdidas económicas que causa esta enfermedad, estimaciones realizadas durante la década del 70 indicaban mermas anuales de U\$115 millones por menor producción (González y col., 1977). En la década del 80, se estimaron pérdidas por más de U\$220 millones por año, debido no solo a una marcada disminución de la producción y a gastos de tratamiento, sino también a la reducción del valor biológico del producto (ALMAST, 1983). En un estudio reciente realizado sobre más de 2.000 vacas en la cuenca de Villa María (Córdoba) se encontró una prevalencia global de mastitis subclínica del 19,4%, y de mastitis clínica del 3%; siendo la prevalencia de mastitis subclínica 2 veces superior en vaquillonas respecto a vacas. El patógeno predominantemente aislado fue *Staphylococcus aureus* (19%), seguido por *Streptococcus spp* (6%) y Enterobacterias (5%). Los costos totales por rodeo, representados por la sumatoria de las pérdidas productivas por mastitis subclínica (elevado RCS), mastitis clínica y gastos de control, fueron promediados en \$559/día y, expresado por cada vaca en ordeño, de \$4,3/vaca/día (Larriestra y Vissio, 2012).

### **I.1.2. MASTITIS POR *Staphylococcus aureus***

Si bien existen cientos de microorganismos causantes de mastitis, entre los asociados a mayores pérdidas económicas se encuentran especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y las bacterias coliformes. Los microorganismos patógenos de mastitis se

categorizan, según su reservorio primario, en contagiosos, ambientales y oportunistas de la flora de la piel (Smith y Hogan, 2001). Dentro de los patógenos contagiosos de mastitis, *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de mayor prevalencia tanto en Argentina (Calvinho y Tirante, 2005), como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi y col., 2006).

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, y su hábitat natural es la piel y las mucosas de los mamíferos (Sutra y Poutrel, 1994). En el caso de los bovinos, puede colonizar la piel de la ubre y el canal del pezón, pudiendo entonces ser transmitido fácilmente entre animales, durante el ordeño (Roberson, 1999). Las mastitis por *S. aureus* producen más daño al tejido mamario que las causadas por otros microorganismos contagiosos y pueden generar disminuciones en la producción láctea hasta de un 45% por cuarto infectado y un 15% por animal (Roberson, 1999).

#### **I.1.2.1. Patogénesis de mastitis por *S. aureus***

La infección de la glándula mamaria ocurre generalmente por vía ascendente. Los organismos pasan a través del conducto del pezón hacia la cisterna del mismo y pueden subsecuentemente establecerse en un área de tejido secretorio (Anderson, 1983). El desarrollo de la IIM y la respuesta de los tejidos a la presencia de *S. aureus* dependen no solo de la efectividad de los mecanismos de defensa del hospedador sino también del índice de multiplicación del microorganismo y del tipo y concentración de los factores de virulencia bacterianos (Schalm y col., 1971). De hecho, estudios recientes de epidemiología molecular han demostrado una asociación entre la presencia de determinados factores de virulencia del microorganismo y la severidad de la mastitis (Fournier y col., 2008). De esta forma, tanto los factores que hacen a los mecanismos de defensa del hospedador como los relacionados con el ataque del patógeno invasor son altamente significativos para determinar el resultado de la infección.

#### **I.1.2.2. Contaminación del pezón**

*Staphylococcus aureus* no es un patógeno obligado de la glándula mamaria, pero se mantiene en la piel de la ubre y los pezones, siendo ésta la principal fuente de *S. aureus* productores de mastitis (Anderson, 1983). Sin embargo, existen en el pezón un número de barreras físicas y químicas que impiden la entrada de microorganismos a la cisterna del mismo. Una de ellas es un tapón de queratina derivado de la epidermis que ocluye el canal del pezón,

y el cual se ha demostrado que, además de actuar como barrera física, contiene componentes bactericidas (Nickerson, 1985). Sin embargo, *S. aureus* es en ocasiones capaz de sortear estas dificultades e ingresar a la cisterna del pezón por propulsión (fuerzas físicas), por crecimiento, o por una combinación de ambos mecanismos, en presencia o ausencia de daño mecánico (Anderson, 1983).

Se considerara que la colonización del extremo del pezón puede ser facilitada por enzimas producidas por *S. aureus*, aunque sería necesario un cierto grado de daño previo al epitelio que exponga un substrato sobre el cual actúen las enzimas, y el cual puede ser generado por infecciones virales, variaciones en la temperatura, o daño químico o físico al pezón durante las prácticas de ordeño (Anderson, 1982; Mamo y col., 1986). Otro mecanismo de invasión del pezón se encuentra relacionado con un mal funcionamiento de la máquina de ordeño, donde fluctuaciones irregulares de vacío generan que los patógenos presentes en la leche o en la punta del pezón sean impulsados dentro del canal y la cisterna (Anderson, 1983).

### **I.1.2.3. Factores de virulencia.**

*Staphylococcus aureus* se caracteriza por la presencia de múltiples factores de virulencia, algunos de los cuales estarían relacionados con la severidad de la IIM que desarrollan en el huésped (Fournier y col., 2008). La identificación de los mismos es crucial para el desarrollo de potenciales inmunógenos destinados al control de la enfermedad.

La expresión de los genes que codifican para los factores de virulencia de *S. aureus* se encuentra controlada por una red compleja de factores de regulación transcripcional (Novick, 2003). Durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferencialmente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase post-logarítmica. Se ha propuesto que, esta expresión bifásica de los factores de virulencia cumpliría con la función de organizar el proceso de infección. Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del huésped facilitando la colonización, lo cual sería seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (serin proteasas, cisteína proteasas, lipasas) (Lowy, 1998). Sin embargo, se ha postulado que para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped, para lo cual regularía negativamente la expresión de factores de virulencia. Esta fina red regulatoria sería la clave en la patogénesis de la infección crónica por *S. aureus*, permitiendo la adaptación del microorganismo a los cambios

del microambiente durante el curso de la infección, y su supervivencia y persistencia intracelular (Tuchscherr y col., 2010).

### **Proteína de unión a Fibronectina (FnBP)**

Una de las propiedades patogénicas de *S. aureus*, que ha sido difícil de evaluar *in vivo*, es el rol de la invasión celular en el huésped durante la infección. Una vez que el patógeno invadió la glándula mamaria, debe superar la acción expulsiva del ordeño frecuente. Es por ello que la adherencia, supervivencia, y multiplicación de *S. aureus* en el epitelio de la glándula mamaria son eventos tempranos decisivos en la patogénesis de la mastitis bovina (Kerro Deogo y col., 2002). Este comportamiento protegería al patógeno de la respuesta inmune del huésped y del tratamiento con antibióticos, contribuyendo a su persistencia en el tejido mamario (Hebert y col., 2000). La capacidad de *S. aureus* de internalizarse en células epiteliales y fagocíticas no profesionales, como células endoteliales y fibroblastos, es considerada uno de los eventos cruciales de la patogénesis de *S. aureus* y, a pesar de la presencia de numerosas adhesinas en el microorganismo, la misma estaría relacionada esencialmente con la expresión de proteínas de superficie de unión a Fibronectina (FnBPs) (Fowler y col., 2000). Las proteínas FnBP-A y FnBP-B, codificadas por los genes *fnbA* y *fnbB*, localizados en tándem en el cromosoma, se encuentran ancladas a la membrana de la pared celular del *S. aureus*. Cada proteína FnBP posee 3 copias de un motivo D de 37-38 aminoácidos, llamados D1, D2 y D3. Las repeticiones D son altamente homólogas entre FnBP-A y FnBP-B. Cada dominio D puede unirse individualmente a la Fibronectina (Fn), aunque con baja afinidad, pero al disponerse en tándem conforman un dominio de unión, D1-3, de alta afinidad (Signas y col., 1989; Jonsson y col., 1991). En un estudio realizado con una mutante isogénica de *S. aureus* deficiente en ambas FnBPs, se observó una disminución del 40% en la capacidad de esta cepa de adherirse a células epiteliales mamarias MAC-T, comparado con la cepa salvaje (Dziewanowska y col., 1999). Otro factor importante en el mecanismo de adherencia sería la existencia de Fibronectina (Fn) sanguínea. Fowler y col. (2000) observaron que, al enfrentar *S. aureus* a una línea celular de ratón en presencia de suero fetal bovino carente de Fn, el nivel de invasión se redujo considerablemente, en comparación con el uso de suero fetal bovino completo. En el mismo trabajo, utilizando una línea mutante de fibroblastos de ratón deficiente en la expresión de la integrina  $\beta 1$ , se observó una reducción del 97% en el nivel de invasión celular de *S. aureus*, comparado con una línea celular productora de integrina  $\beta 1$ . Basados en estos resultados los autores propusieron un modelo de invasión en el cual la Fn formaría un puente entre la FnBP del patógeno y las integrinas del huésped, conduciendo a la internalización bacteriana (Fowler y col.,

2000). En un estudio posterior, Brouillette y col. (2003) utilizaron un modelo de mastitis en ratonas en lactancia, en el que se usó una cepa de *S. aureus* mutante en los genes *fnbA* y *fnbP*, y una salvaje. La presencia de las FnBPs incrementó la capacidad bacteriana de colonizar las glándulas mamarias, aún bajo la presión ejercida por el amamantamiento, comparado con la cepa mutante.

Otro hecho que señalaría la importancia de estas moléculas en la patogénesis de la infección por *S. aureus* es su presencia en la mayoría de las cepas tanto bovinas como humanas. En un estudio realizado en Canadá sobre 62 aislados clínicos humanos, el 87% de las cepas poseía ambos genes *fnbA* y *fnbB* (Rice y col., 2001). En otro trabajo realizado en Irlanda sobre 18 cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística y 14 cepas aisladas de pacientes con neumonía se detectó la presencia de ambos genes en el 97% de las mismas. Sin embargo, la capacidad de adherencia a Fn varió entre diferentes cepas, siendo los aislados de casos de neumonía los que presentaron mayor capacidad de unión (Mongodin y col., 2002). Para el caso de bovinos, la amplificación del gen codificante para la FnBP-A resultó positiva en el 84% de 229 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas en Bélgica (Ote y col., 2011). En un estudio realizado en el sur de Brasil con 85 cepas aisladas de casos de mastitis subclínicas, el 63,5% poseía los genes *fnbP*, y de ellos, 9 seleccionados al azar presentaron una alta expresión durante la fase de crecimiento exponencial *in vitro*, en estudios de PCR cuantitativa (Klein y col., 2012). Si bien existe escasa información sobre la prevalencia de los genes codificantes para la FnBP en cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovinas y el rol específico de la misma en la colonización de la glándula mamaria, las observaciones obtenidas hasta el momento indicarían un importante potencial en el uso de estos antígenos como blancos para el desarrollo de vacunas contra IIM por *S. aureus* (Lammers y col., 1999).

En diversos trabajos, la inmunización de roedores con FnBP recombinante o con péptidos sintéticos compuestos por los aminoácidos esenciales para la unión a Fn, generó anticuerpos capaces de interferir significativamente en la interacción entre FnBP y Fn (Schennings y col., 1993; Huesca y col., 2000). En un modelo de mastitis en ratón, se infectaron las glándulas mamarias con suspensiones de *S. aureus* previamente opsonizadas con un antisuero específico para FnBP recombinante, o suspensiones de bacterias no opsonizadas. El número de bacterias recuperadas de glándulas inoculadas con *S. aureus* opsonizado resultó significativamente menor que el de las glándulas infectadas con bacterias no opsonizadas, observándose además, una menor severidad en el grado de daño al tejido mamario (Mamo y col., 1995). La inmunización de vaquillonas preñadas con un fragmento recombinante conteniendo 2 motivos D de la FnBP adyuvado con Iscom Matrix<sup>TM</sup>, indujo una fuerte producción de anticuerpos, incluyendo IgG<sub>1</sub> e

IgG<sub>2</sub>, tanto en sangre como en leche. La misma se prolongó durante toda la lactancia, y los anticuerpos generados fueron capaces de aumentar la fagocitosis por PMN en ensayos *in vitro* (US/PCT/SE2006/000082). En un estudio posterior, la inmunización de vaquillonas preñadas con una mezcla de plásmidos codificantes para los dominios D1y D3 de la FnBP y ClfA, seguida de un *booster* con las proteínas recombinantes, indujo respuestas celulares y de anticuerpos significativas contra ambos antígenos. Además, proporcionó una protección parcial luego de un desafío experimental con *S. aureus*, mediante una reducción en los recuentos de bacterias recuperadas en leche y alivio de los síntomas clínicos, en comparación con los controles sin inmunizar (Shkreta y col., 2004).

### ***Polisacáridos capsulares (CP)***

*Staphylococcus aureus* produce polisacáridos capsulares (CPs) *in vitro* en condiciones definidas de cultivo (Sutra y col., 1990; Poutrel y col., 1995), los cuales también han sido detectados *in vivo* durante IIM experimentales agudas y crónicas (Hensen y col., 2000). Se ha demostrado que los CP confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos (PMN) bovinos (Sutra y col., 1990; Guidry y col., 1991), la cual es considerada la principal línea de defensa de la glándula mamaria frente a patógenos invasores (Paape y col., 2002). Los anticuerpos dirigidos contra los CP tienen un efecto protector ya que son capaces de opsonizar cepas encapsuladas de *S. aureus*, favoreciendo la fagocitosis por PMN (Sutra y col., 1990). La relevancia de los CPs como candidatos para la generación de respuestas protectoras ha sido resaltada en los últimos años por el hecho de que una de las vacunas comerciales disponibles actualmente para el control de mastitis por *S. aureus* contiene cepas capsuladas de 2 serotipos de CP y un polisacárido de superficie, presentes entre aislados bovinos obtenidos en EE.UU. (Ma y col., 2004). Sin embargo, el efecto protector de los anticuerpos dirigidos contra esos componentes se encuentra relacionado a la prevalencia y distribución de los tipos de CPs en los aislados presentes en cada región geográfica.

Se ha propuesto la existencia de 11 serotipos de CP aislados de infecciones en humanos, sobre la base de aglutinación con antisuero de conejo adsorbido y precipitación en inmunodifusión doble (Karakawa y col., 1985; Sompolinsky y col., 1985). Sin embargo, solamente se han aislado y caracterizado químicamente 4 de ellos (1, 2, 5 y 8), y no existe evidencia suficiente para concluir que los restantes sean cápsulas o estructuras químicamente diferentes de los anteriores (Mckenney y col., 2000). Posteriormente, se describió la presencia de otro tipo capsular, 336, en *S. aureus* aislados de mastitis bovinas (Han y col., 2000); no obstante, la estructura química de este polisacárido no ha sido caracterizada y se ha

demostrado recientemente que aislados que expresan el polisacárido de superficie 336, poseen los genes *cap5* o *cap8* (Verdier y col. 2007). Los polisacáridos capsulares 1 y 2 son de hallazgo infrecuente, mientras que los serotipos CP5 y CP8 han sido aislados de infecciones humanas y bovinas en el mundo (O’Riordan y Lee, 2004). Ambos CP5 y 8 están compuestos por los mismos 3 azúcares (ManNAcA, 1-FucNAc y d-FucNAc), y comparten 12 de los 16 genes involucrados en su expresión (Tuchscher y col., 2010). La misma ocurre *in vitro* principalmente durante la fase de crecimiento post-exponencial, y está influenciada por diversas señales ambientales, como la concentración de sales y el pH (Lee y Lee., 2006).

Los aislamientos de *S. aureus* de rumiantes, muestran cierta variabilidad respecto de la distribución de los CP. En un estudio realizado en Francia, el 51% y 18% de las cepas evaluadas fueron serotipificadas como CP5 y CP8, respectivamente; siendo el resto caracterizadas como no tipificables (31%) (Poutrel y col., 1988). Por el contrario, en un estudio que incluyó 273 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas de 4 establecimientos de EE.UU., el 59% resultó no tipificable, mientras que el 18% y 23% presentaban serotipos 5 y 8, respectivamente (Guidry y col., 1997). Un estudio posterior que incluyó 636 aislamientos de Suecia, Islandia, Irlanda, Dinamarca, Finlandia y EE.UU., determinó que, si bien existían diferencias entre países, la mayoría de las cepas europeas (63%) eran tipificables con antisueros contra los tipos CP5 o CP8, mientras que estos tipos capsulares se encontraron solo en un 42% de los organismos de EE.UU. (Tollersrud y col., 2000), concordando con los hallazgos previos reportados por Guidry y col. (1997). Un estudio realizado en Argentina determinó que solo el 14% de 195 aislamientos de leche bovina fueron caracterizados como serotipos CP5 o CP8 (Sordelli y col., 2000). Sin embargo, más del 70% de los aislamientos pertenecían a la misma provincia, mientras que solamente el 4,6% provenían de las 2 provincias que concentran aproximadamente el 60% de la producción lechera del país (Gutman y col., 2003). En un estudio posterior que incluyó 15 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en distintos rodeos lecheros de la provincia de Buenos Aires, 7 fueron caracterizadas por métodos genotípicos como tipo CP5, mientras que ninguna como tipo CP8 (Reinoso y col., 2008). En un estudio realizado recientemente en nuestro laboratorio se evaluó por PCR la presencia de los locus capsulares *cap5* y *cap8* en 157 *S. aureus* aislados de mastitis clínicas y subclínicas; pertenecientes a las provincias de Santa Fe (n=91), Buenos Aires (n=31), Córdoba (n=22) y Entre Ríos (n=13). El 64% de los aislamientos pudo genotipificarse; resultando el 53% CP5 y el 11% CP8. Además, al evaluar fenotípicamente la presencia de CP, se observó que el 50% de los aislados con genotipo *cap5* o *cap8*, eran capaces de producirlo *in vitro* (Camussone y col., 2012). La caracterización genotípica es altamente significativa debido a que varios factores involucrados en la expresión de cápsula no

han sido completamente definidos, y su expresión *in vivo* no se correlaciona necesariamente con la expresión bajo condiciones *in vitro* (O’Riordan y Lee, 2004). Por esto, los resultados obtenidos de los estudios de genotipificación, remarcan la importancia de la incorporación de cepas productoras de CP a una vacuna prototípica, destinada al control de IIM por *S. aureus* prevalentes en nuestra región.

Las propiedades antifagocíticas de los CP hicieron que, desde épocas tempranas, hayan sido blancos de interés en el diseño de vacunas contra mastitis estafilocócicas. La inmunización de vacas con un vacuna experimental compuesta por una cepa capsulada de *S. aureus* y toxoides, formulada con un adyuvante oleoso, estimuló respuestas significativas de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA e IgM en leche, y resultó eficaz en reducir el número de IIM desarrolladas luego de un desafío experimental (Nickerson y col., 1993). En Argentina, un inmunógeno combinado, compuesto por dos cepas de *S. aureus*, una de *S. uberis* y una de *S. agalactiae*, y formuladas con Al(OH)<sub>3</sub>, confirió protección contra mastitis clínicas y subclínicas por *S. aureus* (Calzolari y col., 1997; Giraudo y col., 1997). Asimismo, la utilización de polisacáridos capsulares conjugados con proteínas en inmunógenos experimentales (Gilbert y col., 1994; Herbelin y col., 1997; Tollesrud y col., 2001) ha generado la producción de anticuerpos de tipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>, reconocidos por su actividad opsonofagocítica. Sin embargo, la inmunización de animales con una cepa de *S. aureus* CP5, generó niveles de anticuerpos específicos contra CP5 significativamente superiores a los detectados en animales inmunizados con CP5 conjugado a albúmina sérica humana (Tollesrud y col., 2001).

### ***Proteína de unión a fibrinógeno (Clumping Factor, Clf)***

Otro componente de *S. aureus* que ha sido propuesto como factor importante de virulencia es el receptor de fibrinógeno de superficie celular, denominado factor de agregación (clumping factor, Clf) (Hawiger y col., 1982). Se encuentra presente en la mayoría de las cepas de *S. aureus* humanas y bovinas (Gonano y col. 2009; Ote y col., 2011; Klein y col., 2012) y su nombre se debe a que su interacción con el fibrinógeno plasmático resulta en una aglomeración instantánea de las células bacterianas. Se han descripto dos factores de agregación, ClfA y ClfB. El ClfA es una proteína compuesta por 933 aminoácidos. La secuencia señal de 39 residuos se ubica en el extremo N-terminal, seguido de una región A de 520 residuos que contiene el dominio de unión a fibrinógeno. Luego, le sigue una región R de 308 residuos, compuesta por 154 repeticiones del dipéptido serina-aspartato. La función de la región R es actuar como soporte para permitir que el dominio de unión al ligando sea expuesto en forma funcional en la superficie celular (Hartford y col., 1997). El ClfB también se encuentra

asociado a la pared celular de *S. aureus* y posee una organización estructural similar a la del ClfA. Posee una secuencia señal seguida de una región A de 540 residuos, luego una región repetitiva R, y finalmente el dominio de anclaje a membrana. Sin embargo, los dominios N y C-terminal de ambas proteínas sólo comparten un 41% y 47% de su secuencia nucleotídica, respectivamente; mientras que la región A de las mismas posee un 26,3% de identidad (Ní Eidhin y col., 1998). El ClfB se une a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del fibrinógeno, mientras que el ClfA sólo reaccionaría con la cadena  $\gamma$  (Ní Eidhin y col., 1998; McDevitt y col., 1997).

Se ha sugerido que el ClfB se expresa sólo durante la fase temprana de crecimiento exponencial y que luego sería degradado de la superficie por proteasas bacterianas (Ní Eidhin y col., 1998), mientras que el ClfA estaría presente en todo el ciclo de crecimiento (Hartford et y col., 1997). Sin embargo, en un estudio reciente realizado en un modelo murino de bacteremia e infección de herida con diferentes cepas de *S. aureus*, se demostró que la expresión del ClfA es heterogénea y dependiente del microambiente de infección y de la cepa utilizada (Nanra y col., 2009). Por ejemplo, el cultivo de *S. aureus* en presencia de altas concentraciones de IL-1 $\beta$  favoreció la expresión de ARNm para ClfA y FnBP; sugiriendo que el entorno inflamatorio desarrollado por el huésped podría influenciar el potencial patogénico del microorganismo (Kanangat y col., 2007).

Higgins y col., (2006) evaluaron las propiedades anti-fagocíticas del ClfA por PMN humanos *in vitro*. La fagocitosis de la cepa Newman salvaje se vio significativamente inhibida, siendo ingerida por aproximadamente un 46% de PMN, comparado con un 72% obtenido para la cepa mutante en el gen *clfA*. Además, las propiedades anti-fagocíticas de la cepa productora de ClfA se vieron aumentadas en presencia de fibrinógeno soluble. Estos resultados llevaron a los autores a proponer dos mecanismos de resistencia a la fagocitosis; uno dependiente de fibrinógeno y otro independiente del mismo. Esto reflejaría la presencia de diferentes nichos para la bacteria dentro del huésped durante la progresión de la enfermedad, según el fibrinógeno se encuentre o no disponible (Higgins y col., 2006). Otro mecanismo propuesto de disminución de fagocitosis sería la escisión del componente C3b del sistema complemento en su forma inactiva, iC3b, mediante el Factor de complemento I. Cuando *S. aureus* se encuentra opsonizado con C3b, el ClfA sería capaz de localizar el Factor I en la superficie celular y además actuar como cofactor, aumentando la actividad del mismo y favoreciendo el pasaje de C3b a iC3b, inhibiendo de esta forma la activación de la cascada del complemento (Hair y col., 2010).

En investigaciones realizadas en ratones, la inmunización con un plásmido codificante para ClfA indujo una fuerte producción de anticuerpos específicos; los cuales fueron capaces de favorecer la fagocitosis *in vitro* de *S. aureus* por macrófagos murinos. Las bacterias pre-

incubadas con los anticuerpos generados mostraron ser menos virulentas en un modelo *in vivo* de mastitis murina. Sin embargo, la inmunización con la vacuna a ADN no fue efectiva para proteger a los ratones de un desafío intra-peritoneal (Brouillette y col., 2002). La administración intra-nasal de una mezcla de vectores plasmídicos codificantes para cuatro adhesinas de *S. aureus*, entre ellas, ClfA en ratones indujo niveles elevados de anticuerpos específicos, los cuales fueron capaces de inhibir la adhesión de la bacteria a células epiteliales de la glándula mamaria y de proteger contra la infección de las glándulas mamarias, en un modelo de mastitis murino (Castagliuolo y col, 2006). En un estudio reciente, Tuchscher y col. (2008) inmunizaron pasivamente ratones lactantes con anticuerpos anti-polisacárido capsular 5, 8, anti-ClfA y una mezcla de ellos. Los ratones inmunizados con los anticuerpos individuales tuvieron menores recuentos bacterianos en los tejidos luego de 4 días de realizado el desafío experimental con una cepa encapsulada. La inmunización con la combinación de anticuerpos logró disminuir significativamente la carga bacteriana en las glándulas mamarias y permitió además evitar el desarrollo de mutantes no encapsuladas (Tuchscher y col., 2008). La inmunización de ratones con un péptido conteniendo la región A del ClfA, indujo niveles significativamente mayores de anticuerpos específicos, en comparación con una suspensión de células enteras de *S. aureus* inactivadas; los cuales fueron capaces de favorecer la fagocitosis por PMN bovinos (Gong y col., 2010). Luego de una infección intramamaria experimental, los animales inmunizados con el antígeno recombinante presentaron los menores recuentos de bacterias en las glándulas mamarias y una mayor preservación de la integridad del tejido (Gong y col., 2010).

En cuanto a la evaluación en bovinos, la inmunización de animales con plásmidos conteniendo la secuencia codificante para la región A del ClfA, indujo una fuerte respuesta de anticuerpos anti-ClfA en sangre y leche, en comparación con los animales inmunizados con plásmidos vacíos. Los mismos, resultaron eficientes en favorecer la opsonofagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos *in vitro* y bloquear la adherencia del microorganismo a células epiteliales MAC-T. Luego de un *booster* con el antígeno recombinante, la respuesta humoral se vio significativamente incrementada, así como la funcionalidad de los anticuerpos generados en cuanto a su capacidad de opsonización e inhibición de la adherencia celular (Nour El-Din y col., 2006).

### **Toxina Beta**

La  $\beta$ -toxina de *S. aureus* es una exoproteína hemolítica, con acción esfingomielinasa, capaz de ejercer daño sobre las membranas de diferentes tipos de células *in vitro* (McCartney y

Arbuthnott, 1978). Observaciones tempranas indicaron la predominancia de cepas productoras de  $\beta$ -toxina entre *S. aureus* aislados de mastitis bovinas (Bryce y Rountree, 1936), lo que hizo suponer un rol importante de la misma en la patogénesis de *S. aureus* en la glándula mamaria bovina. Más tarde, en un estudio donde se evaluó por PCR la presencia del gen que codifica para la toxina (*hlb*) en 105 cepas aisladas de casos de mastitis bovinas, el 96% de las mismas resultaron positivas, aunque solo el 80% de ellas presentaron actividad hemolítica en placas con Agar Sangre. Sin embargo, luego de sub-cultivar las cepas que resultaron negativas en sangre o leche bovina, el 90% de ellas expresaron toxina, sugiriendo que la producción de la misma se encuentra, de alguna manera, regulada por uno o más factores presentes en estos fluidos bovinos (Aarestrup y col., 1999). Larsen y col., (2002) confirmaron esta prevalencia mostrando que el 97% de cepas aisladas de mastitis bovinas en Europa y EE.UU. poseían el gen codificante para  $\beta$ -toxina o mostraban acción hemolítica por esta toxina en Agar Sangre. En un estudio reciente realizado en Bélgica, donde se caracterizaron genotípicamente 229 cepas bovinas, el 99% de las mismas presentó el gen *hlb* (Ote y col., 2011).

Se ha demostrado que la  $\beta$ -toxina de *S. aureus* es capaz de actuar sobre neutrófilos (Marshall y col., 2000) y linfocitos; específicamente, linfocitos T proliferativos (Huseby y col., 2007). Debido a las probables contaminaciones de las preparaciones de toxina con trazas de otras citolisinas y la susceptibilidad diferencial entre especies hacia la misma, la literatura ha sido algo variable en cuanto a los efectos de la toxina en leucocitos. Marshall y col. (2000) demostraron por microscopía electrónica y ensayos biológicos que tanto linfocitos como neutrófilos humanos son susceptibles a  $\beta$ -toxina, y que la citotoxicidad se ve incrementada en presencia de  $Mg^{++}$ . Sin embargo, ambos tipos celulares se consideran menos sensibles que los eritrocitos ovinos, probablemente debido a un menor contenido de esfingomielina en la membrana celular. Utilizando un modelo de mastitis murino se evaluó el poder patógeno de la toxina en términos de mortalidad, cambios clínicos, microscópicos y de recuperación de microorganismos de las glándulas mamarias. Para ello se empleó toxina parcialmente purificada o una cepa aislada de mastitis bovina productora de solamente de  $\beta$ -toxina. La inoculación de toxina parcialmente purificada produjo solo una leve infiltración de neutrófilos en los alvéolos, mientras que la inyección de *S. aureus* generó lesiones vasculares severas con presencia de agregados de bacterias (Calvinho y col., 1993), sugiriendo que el rol patogénico de la misma podría estar influenciado por la interacción con otras enzimas y toxinas que dañan membrana. De hecho, en un estudio más reciente realizado *in vitro* con células humanas se observó que la toxina  $\beta$  afecta linfocitos de sangre periférica, específicamente, células T

proliferativas, actuando así en la evasión de los mecanismos inmunes mediante la interacción con factores de virulencia accesorios, como por ejemplo, superantígenos (Huseby y col., 2007).

Debido a la dificultad metodológica encontrada en la obtención de las preparaciones puras de toxinas, cobraron importancia los estudios realizados con cepas mutantes deficientes en las mismas. Sin embargo, existen pocos antecedentes de experimentaciones con este tipo de cepas, y los resultados son poco concluyentes. En 1989, Bramley y col. generaron mutantes deficientes en la toxina mediante lisogenización con un bacteriófago que se integra en el gen codificante. Las glándulas inoculadas con *S. aureus* productores de toxina mostraron recuentos significativamente mayores que aquellas inoculadas con las cepas mutantes, así como un mayor número de PMN y macrófagos. Los ratones infectados con las cepas toxigénicas murieron o presentaron signos más severos de enfermedad, en comparación con los infectados con las cepas mutantes. En un estudio posterior, se generaron cepas mutantes deficientes en  $\beta$ -toxina mediante la inactivación del gen *hly* por inserción de un gen de resistencia a gentamicina en su secuencia. En el mismo, la  $\beta$ -toxina generó un incremento en el número de *S. aureus* adheridos a monocapas de células epiteliales mamarias, así como el número y tamaño de colonias, la proliferación del microorganismo y el número de células epiteliales infectadas (Cifrian y col., 1996a). Frente a este resultado, los autores propusieron que el efecto de la  $\beta$ -toxina en el incremento de la adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales de la glándula mamaria se debería a un cambio en la carga de la superficie de las células dañadas. La  $\beta$ -toxina hidrolisa la esfingomielina presente en la membrana plasmática resultando en un incremento de la permeabilidad con pérdida progresiva de la carga de la superficie celular (Low y Feer, 1977). Asimismo, Shompole y col. (2003) demostraron que el escape de *S. aureus* de los endosomas coincide con un pico de expresión de los genes *hly* y *hly*, y que el daño a las membranas de las células citoplasmáticas infectadas ocurre luego de un segundo pico de producción, por lo que argumentaron que la toxina  $\beta$  podría estar implicada tanto en la ruptura de la membrana del endosoma, resultando en el escape de la bacteria al citoplasma, como en la apoptosis celular. En un estudio reciente, una cepa de *S. aureus* doble mutante deficiente en las moléculas  $\beta$ -toxina y catalasa, mostró un incremento de la persistencia intracelular *in vitro* en cultivos de macrófagos murinos y células MAC-T, y aumento de la virulencia en ratones, en comparación con las mutantes simples o la cepa salvaje (Martinez Pulgarín y col., 2009). Sin embargo, el mecanismo por el cual estas dos moléculas contribuirían sinérgicamente a la patogénesis intracelular de *S. aureus* en dichas líneas celulares, no ha sido aún dilucidado.

Existen pocos antecedentes de la utilización de la  $\beta$ -toxina en preparaciones de

inmunógenos destinadas al control de infecciones por *S. aureus*. En un estudio realizado en Noruega, se inmunizaron vaquillonas preñadas con un inmunógeno compuesto por una mezcla de una cepa de *S. aureus* encapsulada inactivada y los toxoides  $\alpha$  y  $\beta$ . Los animales inmunizados desarrollaron niveles elevados de IgG anti-cápsula y anti-  $\alpha$ -toxina, aunque los niveles de anticuerpos específicos para  $\beta$ -toxina no difirieron significativamente de los presentes en los animales control (Nordhaug y col., 1994b). Sin embargo, las formulaciones no resultaron efectivas en reducir la aparición de mastitis clínicas o subclínicas de forma significativa (Nordhaug y col., 1994a). En un estudio con vacas en lactancia, Hwang y col., (2000) aislaron cepas de *S. aureus* productoras de  $\alpha$  y  $\beta$  hemólisis de vacas con mastitis subclínicas, y a partir de las mismas realizaron preparaciones de bacterina-toxoide, que utilizaron para la inmunización autógena de cada uno de los animales. La inmunización indujo un incremento significativo de los anticuerpos específicos en los animales inmunizados, respecto de los controles. El 27% de los cuartos infectados tuvieron cura bacteriológica luego de la inmunización, mientras que sólo lo hicieron un 5% de los cuartos del grupo control. Además, no se registraron nuevos cuartos infectados en los animales inmunizados, mientras que 3 cuartos en el grupo control presentaron nuevas IIM (Hwang y col, 2000).

### **I.1.3. INMUNOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

#### **I.1.3.1. Mecanismos de defensa**

La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que pueden ser separados en dos diferentes categorías: inmunidad innata e inmunidad específica. Ambos tipos de respuesta interactúan estrechamente en la protección contra microorganismos causantes de mastitis (Sordillo y col., 1997). Primero, la respuesta inmune innata estimula a la adquirida e influencia sobre su naturaleza. Segundo, la inmunidad adquirida utiliza muchos mecanismos efectores innatos para eliminar los microorganismos, y su acción frecuentemente incrementa, a su vez, la actividad antimicrobiana de la respuesta innata. La eficiencia de estas respuestas determina la susceptibilidad o resistencia de la glándula mamaria a la infección (Oviedo-Boyso y col., 2007).

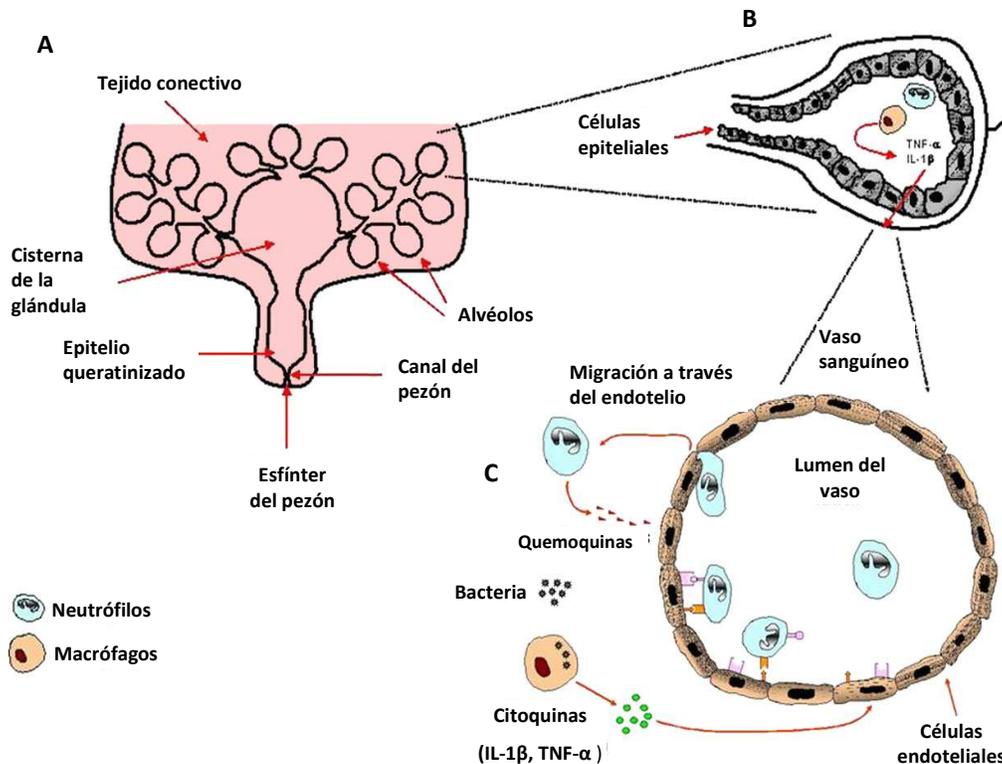
Diversos autores revisaron, durante los últimos años, la inmuno-biología de la glándula mamaria, y sus mecanismos de respuesta frente a infecciones (Sordillo y col., 1997; Sordillo y Streicher, 2002; Rainard y Riollet, 2006; Oviedo-Boyso y col., 2007). La inmunidad innata, predomina durante el estadio temprano de la infección, y está mediada por macrófagos, neutrófilos, células NK y ciertos factores solubles. A pesar de que esta respuesta involucra

mecanismos que no son antígeno-específicos, no debe entenderse como una respuesta no específica, ya que presenta especificidad molecular (Vivier y Malissen, 2005). La inmunidad innata existe previamente al encuentro del patógeno y se activa rápidamente en el sitio de infección por numerosos estímulos, pero no aumenta con la exposición repetida al mismo antígeno. La acción de la respuesta innata está formada por 2 tipos de componentes; los residentes, que están presentes en la escena y son inducidos cuando el patógeno ingresa, y aquellos que deben movilizarse hacia el órgano específico donde se desarrolla la infección. La unión entre estas defensas innatas es mediada por la inflamación, por lo que, cuando las defensas residentes no son suficientes para contener o erradicar la infección, las defensas sistémicas son reclutadas (Rainard y Riollot, 2006). Si los mecanismos de defensa innata funcionan adecuadamente, muchos patógenos son eliminados rápidamente dentro de un período de tiempo corto y antes de que la respuesta inmune específica se active. La eliminación rápida de la bacteria con frecuencia no resulta en cambios en la calidad de la leche o disminución de la producción (Sordillo y Streicher, 2002). Si el patógeno es capaz de evadir el sistema de defensa innato o no es eliminado, el sistema de defensa de la inmunidad adquirida es disparado. La respuesta inmune adquirida reconoce determinantes antigénicos específicos del patógeno, y si el hospedador debe enfrentar al antígeno más de una vez, un estado elevado de reactividad inmune puede ocurrir como consecuencia de la memoria inmunológica. En comparación con la primera exposición, la respuesta de memoria puede ser mucho más rápida, considerablemente más fuerte, más duradera y, con frecuencia, más efectiva en remover o eliminar al patógeno (Sordillo y Streicher, 2002).

### ***Defensas anatómicas***

El canal del pezón es considerado la primera línea de defensa contra la mastitis, ya que la bacteria debe penetrar a través de él para causar una IIM (Figura 2). El pezón contiene un esfínter muscular cuya función es mantener cerrado el canal entre ordeños y por lo tanto, aislado el interior de la glándula mamaria. El daño o abrasión de esta estructura ha sido observado como un factor predisponente para el aumento de la colonización bacteriana y desarrollo de IIM (Myllys y col., 1994). El canal del pezón también está cubierto con queratina, lo que provee una barrera física adicional, previniendo la migración de bacterias hacia la cisterna de la glándula mamaria (Sordillo y Streicher, 2002). Debido a su rica composición en proteínas básicas y ácidos grasos, la queratina actuaría ejerciendo un efecto de adsorción de las bacterias, impidiendo su paso y futura colonización de la glándula. Además, ciertas proteínas catiónicas asociadas con la queratina son capaces de unirse a los patógenos de

mastitis incrementando su susceptibilidad a cambios de osmolaridad y ocasionando su lisis (Paulrud, 2005). A medida que se acerca el momento del parto, aumenta la acumulación de fluidos en la glándula mamaria, causando un incremento de la presión intramamaria. Esto trae como consecuencia la dilatación del canal y la pérdida de secreciones mamarias, conduciendo a una mayor susceptibilidad a mastitis durante ese período (Sordillo y Streicher, 2002).



**Figura 2. A)** Diagrama esquemático mostrando de los factores anatómicos más importantes de la glándula mamaria bovina que actúan como barreras de defensa. El esfínter del pezón representa la primera línea de defensa, mientras que el epitelio queratinizado de la cisterna es considerada la segunda línea. **B)** Factores celulares y solubles que participan en la respuesta innata en la glándula mamaria. Los macrófagos localizados en los alvéolos fagocitan las bacterias que entran en la cisterna de la glándula mamaria. Los macrófagos activados liberan citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . **C)** Células endoteliales de vasos sanguíneos adyacentes a los alvéolos expresan moléculas de adhesión en respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias; éstas, a su vez, facilitan el reclutamiento de neutrófilos del torrente sanguíneo al sitio de infección, para eliminar las bacterias invasoras (Oviedo Boyso y col., 2007).

### ***Defensas celulares***

Si las bacterias son capaces de atravesar el esfínter del pezón y penetrar en el canal del mismo, la segunda línea de defensa consiste en las células del sistema inmune innato y adaptativo, como macrófagos, neutrófilos, y linfocitos. El número y actividad de las poblaciones leucocitarias juega un rol vital en la determinación de la severidad y duración de las IIM (Sordillo y Streicher, 2002).

*Macrófagos:* constituyen el tipo celular predominante en leche y tejidos de la glándula mamaria bovina sana, durante el período de lactancia. En la patogénesis bacteriana, los macrófagos pueden facilitar la respuesta inmune innata o adquirida. Las funciones de los macrófagos en el sistema de defensa innato son fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de oxígeno. Más allá de la actividad como fagocitos profesionales, la habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad de otros tipos celulares, sería la de mayor importancia en la respuesta innata de la glándula mamaria (Sordillo y Streicher, 2002). De hecho, cuando los macrófagos reconocen bacterias, disparan la liberación de prostaglandinas y leucotrienos que aumentan el proceso inflamatorio local, y estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que favorecen la actividad bactericida de los neutrófilos (Bannerman y col, 2004b). Los macrófagos también juegan un rol en el desarrollo de la respuesta inmune específica a través del procesamiento y presentación de antígenos en asociación con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) II (Sordillo y Streicher, 2002).

Una alteración dramática de las capacidades funcionales de los macrófagos ocurre durante el parto y ha sido directamente relacionada con la incidencia de enfermedad. Aunque el número de macrófagos bovinos es alto en la última semana de gestación, la capacidad fagocítica de estas células decrece, posiblemente debido a la baja actividad opsónica en secreción mamaria y a una disminución de la IgM. Adicionalmente, la expresión de MHC-II por los macrófagos bovinos durante el parto disminuye, lo cual podría contribuir a una pobre presentación de antígenos y como resultado, una débil respuesta inmune específica de los linfocitos de la glándula mamaria (Mallard y col., 1998).

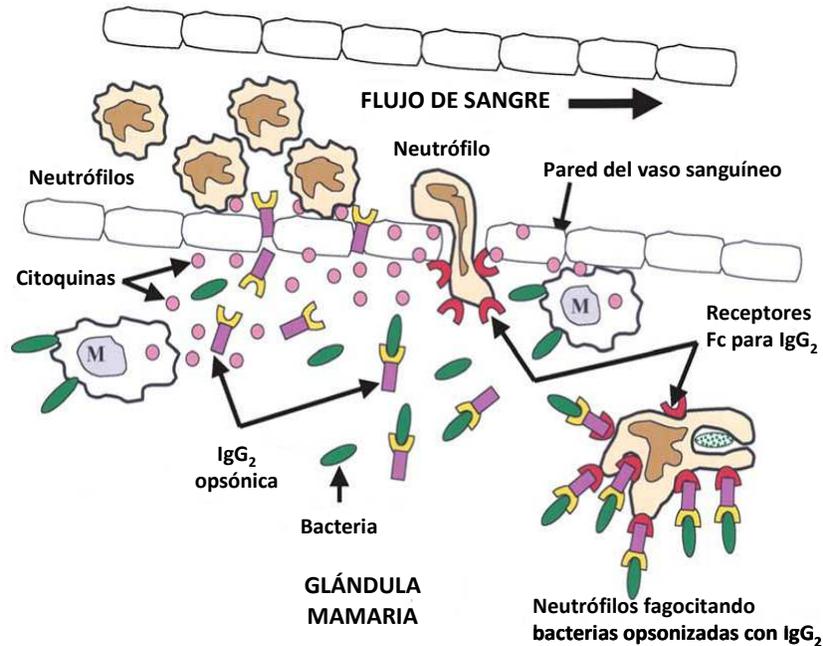
*Neutrófilos:* Los neutrófilos (PMN) constituyen el principal tipo celular encontrado en tejido y secreción mamaria durante el periodo temprano del proceso inflamatorio asociado con la infección bacteriana (Paape y col., 2000). Aunque el número de PMN es relativamente bajo en

la glándula mamaria sana, estas células pueden constituir un porcentaje mayor al 90% del total de la población leucocitaria durante la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002). Cuando una bacteria traspasa el esfínter y penetra al canal del pezón, los macrófagos de la leche reconocen al patógeno invasor e inician la respuesta inflamatoria, liberando, junto con las células epiteliales, quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias. Éstas, activan la expresión de moléculas de adhesión celular, intracelular y vascular, causando la unión de los neutrófilos al endotelio y permitiendo su migración (diapédesis) desde la sangre a través del epitelio y la matriz subepitelial, y su posterior localización en el sitio de infección (Oviedo-Boyso y col., 2007). La acción mecánica de la máquina de ordeño también causa la migración de los PMN de la sangre al tejido mamario, por lo que la glándula mamaria estéril está abastecida con una fuente constante de neutrófilos (Paape y col., 1992). Sin embargo, los PMN de la leche son fagocitos menos eficientes que los de sangre. Por un lado, la diapédesis a través del epitelio mamario utiliza reservas de energía de los PMN, que resulta en una reducción de la fagocitosis y actividades bactericidas. Por otro lado, luego de entrar a la glándula mamaria, los PMN ingerirían grasas y caseínas de la leche, lo cual causa una pérdida de los gránulos citoplasmáticos y de los pseudópodos necesarios para la fagocitosis (Paape y col., 2002). El ordeño remueve los PMN comprometidos, y estos son reemplazados por nuevos PMN, lo cual refuerza las defensas contra las infecciones bacterianas. Este fenómeno podría explicar, parcialmente, la reducida incidencia de mastitis clínicas en vacas ordeñadas cuatro veces por día comparadas con vacas ordeñadas dos veces por día (Hillerton, 1991).

Los PMN reclutados al sitio de la infección fagocitan bacterias y producen especies reactivas del oxígeno, péptidos anti-bacterianos y defensinas, las cuales eliminan una amplia variedad de patógenos que causan mastitis (Paape y col., 2003). Burton y Erskine (2003), revisaron una variedad de estudios donde se demostró una relación inversa entre la capacidad de reclutamiento de PMN en la glándula mamaria y la aparición de IIM. En general, los animales que experimentan curas espontáneas, presentan respuestas de PMN rápidas y masivas, mientras que los animales con baja o ausente respuesta de PMN, sucumben a formas severas o hiperagudas de mastitis.

El proceso de fagocitosis de las bacterias causantes de mastitis se ve favorecido si los patógenos se encuentran previamente opsonizados con anticuerpos derivados de la sangre, especialmente de la subclase IgG<sub>2</sub>. Los anticuerpos específicos reconocen a la bacteria a través de las regiones Fab, y se unen a los PMN a través de los receptores Fc, presentes en la membrana plasmática de los mismos (Paape y col., 2002). El pico de entrada de IgG<sub>2</sub> a la glándula mamaria ocurre luego de unas 4 horas de comenzada la infección, unas 6-12 horas

previas al pico de ingreso de los PMN; esta coordinación permite que los microorganismos ya se encuentren cubiertos de anticuerpos opsonizantes al momento del primer arribo de PMN a la leche, lo que permitiría una eliminación más efectiva de la infección (Burston y Erskine, 2003).



**Figura 3.** Neutrófilos sanguíneos reclutados hacia la glándula mamaria cuando los macrófagos tisulares (M), células epiteliales mamarias y células endoteliales de los vasos sanguíneos secretan citoquinas (puntos rosas) luego de entrar en contacto con la bacteria invasora (barras verdes). En el camino hacia la glándula, los PMN regulan positivamente los receptores Fc para IgG<sub>2</sub> (discos rojos). Cuando los anticuerpos IgG<sub>2</sub> opsonizantes (Y violetas y amarillos) filtran al cuarto inflamado desde la sangre durante el edema temprano, se unen a antígenos específicos de la bacteria (opsonización) y favorecen la eficiente fagocitosis por los PMN reclutados (Burton y Erskine, 2003)

Durante el parto, la población de PMN exhibe una función disminuida en las actividades relacionadas con la defensa (fagocitosis, producción de aniones superóxido) así como en su migración celular y quimiotaxis (Kehrl y col., 1989). Esta última actividad puede estar alterada debido a la proporción disminuida de células que expresan el receptor de adhesión CD62L (L-selectina) que es necesario para la penetración a través del endotelio al sitio de infección (Lee y Kehrl, 1998). Una depleción de neutrófilos resulta en un dramático incremento de la susceptibilidad a las IIM (Mallard y col., 1998).

Linfocitos: Si la bacteria invasora de la glándula mamaria sobrevive, la infiltración de neutrófilos es reemplazada, luego de un corto período, por linfocitos T y B. Los linfocitos pueden reconocer una amplia variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana que definen la especificidad, diversidad y las características de memoria del sistema inmune.

Los linfocitos T se clasifican en 2 grupos principales:  $T\alpha\beta$  y  $T\gamma\delta$ . En la glándula mamaria bovina sana predominan los linfocitos  $T\alpha\beta$  que expresan el fenotipo CD8+ fundamentalmente, en contraste con los de sangre periférica que expresan primariamente el fenotipo CD4+ (Asai y col., 1998). Dependiendo del estadio de la lactancia y de la localización en el tejido, el porcentaje de cada subconjunto de linfocitos puede variar significativamente y, en ocasiones, estos cambios se correlacionarían con una mayor susceptibilidad a enfermedades (Mallard y col., 1998). Durante la mastitis, prevalecen los linfocitos T CD4+ que son activados en respuesta al reconocimiento de los complejos antígeno-MHC-II en las células presentadoras de antígenos, como linfocitos B o macrófagos. Cuando un linfocito T CD4+ madura, puede diferenciarse hacia, al menos, 4 fenotipos de células Th, caracterizados según sus factores de transcripción, perfiles de citoquinas y funciones efectoras en: células Th1 (respuesta citotóxica pro-inflamatoria, productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2), Th2 (respuesta humoral mediada por células B, productoras de IL-4, IL-5 e IL-13), Th17 (respuesta mediada por neutrófilos, productoras de IL-17 e IL-22) y Treg (respuesta regulatoria, productoras de IL-10) (Zhu y col., 2010). Durante el periparto, las células CD4+ expresan menos IFN- $\gamma$  e IL-2 y aumentan la expresión de IL-4, IL-5 e IL-10, en comparación con las células CD4+ obtenidas sobre el final de la lactancia (Shafer-Weaver y col., 1999). Estas observaciones sugieren que la activación linfocitaria hacia una vía Th<sub>2</sub>, tendría influencia sobre la respuesta inmune frente al patógeno y la susceptibilidad a IIM presentada en el periparto; aunque dicho mecanismo no ha sido aún confirmado.

Las células T CD8+ poseen funciones tanto citotóxicas como supresoras, y por lo tanto pueden eliminar células del hospedador que expresen antígenos extraños (en asociación con el MHC-I) o pueden controlar o modular la respuesta inmune durante la infección bacteriana. Se ha sugerido que las células T CD8+ citotóxicas pueden actuar como “depuradores” (scavengers) removiendo células secretoras viejas o dañadas, las cuales pueden incrementar la susceptibilidad de la glándula mamaria a las infecciones (Taylor y col., 1994). La evaluación de secreciones lácteas de glándulas mamarias bovinas infectadas con *S. aureus* revela una subpoblación de linfocitos T CD8+ activados que son capaces de alterar o suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ (Park y col., 1993). Los roles inmuno-regulatorios de los linfocitos T CD8+ también dependen del estadio de la lactancia. En un estudio realizado con

células de sangre periférica de vacas lecheras, se observó que linfocitos T CD8+ obtenidos en la mitad de la lactancia exhibían actividades citotóxicas y expresaban IFN- $\gamma$ , mientras que los obtenidos durante el período post-parto temprano no presentaban actividad citotóxica y expresaban principalmente IL-4 (Shafer-Weaver y Sordillo, 1997). La predominancia del fenotipo supresor de las células CD8+ en el periparto, podría ser una de las razones que expliquen el incremento de la incidencia de IIM en dicho momento.

Las células T $\gamma\delta$  no han sido bien caracterizadas, pero se sugiere que tendrían capacidad citotóxica, lo que las convertiría en una importante línea de defensa contra agentes infecciosos, particularmente patógenos intracelulares (Skyberg y col., 2011). En 1999, Soltys y Quin mostraron un aumento de estas células en sangre durante IIM estafilocóccicas. Tanto en humanos como en bovinos, se ha propuesto que las interacciones que desencadenan la activación de las células T $\gamma\delta$  serían independientes de MHC y dependientes del Receptor de células T (TCR). Además, estas células podrían ser directamente activadas por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en ausencia de células presentadoras de antígeno, lo cual tendría implicancias en su rol en la inmunidad innata (Plattner y Hostetter, 2011). La contribución de las variaciones de los linfocitos T $\gamma\delta$  en la inmunidad global de la glándula mamaria no está del todo clara, debido a que las funciones biológicas de estas células son aún especulativas.

El rol primario de los linfocitos B es producir anticuerpos contra patógenos invasores. A diferencia de los macrófagos y neutrófilos, los linfocitos B utilizan receptores de la superficie celular para reconocer patógenos específicos. En forma similar a los macrófagos y células dendríticas pueden funcionar como células presentadoras de antígenos, internalizando, procesando y presentando al antígeno en el contexto del MHC-II a linfocitos T CD4+. Después de la presentación del antígeno procesado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce a su vez la proliferación y diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células de memoria. A diferencia de los linfocitos T, la población de los linfocitos B en sangre permanece prácticamente constante durante todo el período de lactancia (Van Kampen y Mallard, 1997).

Las células NK son linfocitos grandes y granulares que tienen actividades citotóxicas independientes del MHC, por lo que pertenecen al sistema inmune innato. Expresan receptores que reconocen las moléculas MHC-I sin péptido unido y, a diferencia lo que ocurre con el receptor T, dicho reconocimiento da lugar a una inhibición en lugar de una activación celular. Si la célula NK puede reconocer la molécula de MHC-I en la superficie celular, no se envía la señal inhibitoria y la célula diana es eliminada (Lanier, 2005). En su fase efectora, la

célula NK libera sus gránulos conteniendo perforinas y granzimas que destruyen la célula diana por disrupción de la membrana celular (Bryceson y col., 2006). También pueden eliminar las células blanco mediante la inducción de la apoptosis, aunque con menor eficiencia (Screpanti y col., 2005). Esta función citotóxica las hace vitales para la remoción de patógenos intracelulares y eliminación de células tumorales (Rainard y Riollet, 2006). Las células NK también son capaces de matar bacterias Gram negativas y positivas, lo que les confiere importancia en la prevención de las infecciones mamarias (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996). Sin embargo, prácticamente no existen estudios donde se aborde el rol exacto de las mismas en las IIM, y los cambios en dicha población celular, tanto frente a infecciones como en el periparto, no han sido evaluados.

***Defensas solubles:***

Los factores solubles específicos e innatos representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria que puede despertar una respuesta protectora efectiva en contra de la invasión de patógenos.

*Sistema complemento:* El complemento es un conjunto de proteínas presentes en suero y leche que pueden impactar en la inmunidad innata y adquirida. Las proteínas que componen el sistema de complemento son sintetizadas principalmente por los hepatocitos, y por otras células como monocitos y macrófagos tisulares. Muchas de las actividades biológicas del complemento están mediadas por receptores específicos localizados en una variedad de células. Las funciones efectoras del complemento incluyen lisis de bacterias, opsonización y atracción de los fagocitos al sitio de la activación del complemento (Korhonen y col., 2000). La concentración de complemento en secreciones mamarias ha sido determinada por la medición de sus actividades hemolíticas y bactericidas (Rainard y Poutrel, 1995; Riollet y col., 2000a). La concentración más baja se observa en leche de glándulas mamarias sanas durante la lactancia. En contraste, la mayor concentración de complemento se observa en calostro, leches mastíticas y en secreción mamaria obtenida durante la involución, presumiblemente debido a la filtración de los componentes desde la sangre (Riollet y col., 2000a). Sin embargo, el significado global del sistema de complemento en la defensa de la glándula mamaria no ha sido aún bien definido.

*Inmunoglobulinas:* Los primeros efectores solubles de la respuesta inmune específica son

los anticuerpos producidos por los linfocitos B activados por antígenos. Son tres las clases de inmunoglobulinas (Ig) que influyen en los mecanismos de defensa antibacterianos en la glándula mamaria: IgM, IgA e IgG, incluyendo, de esta última, las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, (Guidry y Miller, 1986). En general, las inmunoglobulinas alcanzan su pico máximo de concentración en secreciones mamarias durante la calostrogénesis y los procesos inflamatorios.

Algunos estudios otorgaron a la IgM un importante rol como opsonina para la fagocitosis por neutrófilos; sin embargo, esta Ig debe fijar complemento para alcanzar una efectiva opsonización para mediar la fagocitosis por PMN en leche (Nonnecke y Harp, 1989). No obstante, las concentraciones en leche de los componentes del sistema complemento varían según el período de lactancia, el estado de salud de la glándula mamaria, o el microorganismo causante de la IIM; por lo tanto su rol en la defensa de la glándula mamaria bovina es aún discutido (Rainard y Riollet, 2006). Además, la IgM no es una subclase de anticuerpo predominante en leche normal ni en leche mastítica y se estima que los PMN se despojan de los receptores Fc para IgM a medida que migran desde sangre al tejido mamario. Es posible que su rol esté relacionado con la neutralización de endotoxinas en la glándula mamaria, aunque no es claro como colaboraría con la función de los PMN en leche (Burton y Erskine, 2003).

La IgG<sub>1</sub> es la subclase mayoritaria en leche bovina normal debido a su transporte selectivo desde sangre a glándula mamaria (Guidry y col., 1980), presumiblemente para proveer inmunidad pasiva a la cría (Kehrli y Harp, 2001). En contraste a lo que ocurre con la IgG<sub>2</sub>, los neutrófilos bovinos generalmente no expresan receptores de Fc para IgG<sub>1</sub>; por lo que se sugiere que el rol de estos anticuerpos estaría relacionado con la neutralización de endotoxinas, bloqueo de la colonización bacteriana y promoción de la fagocitosis mediante la fijación de complemento (Rainard y Boulard, 1992). Algunos autores proponen que las altas concentraciones naturales de IgG<sub>1</sub> en la glándula mamaria sana pueden ser importantes en la defensa inmune frente a mastitis. Sin embargo, los roles exactos de esta subclase en la defensa inmune frente a IIM no ha sido aún determinada, incluyendo su impacto en el sistema de defensa mediado por PMN en leche.

La IgG<sub>2</sub> se considera la principal opsonina para la fagocitosis por PMN en leche de glándula mamaria infectadas, ya que los mismos aumentan la expresión de receptores Fc de alta afinidad específicos para los complejos patógeno-IgG<sub>2</sub> a medida que migran al tejido infectado (Paape y col., 2000). Las concentraciones de IgG<sub>2</sub> en leche normal son extremadamente bajas, por lo que la actividad opsónica en las ubres sanas es reducida. Sin embargo, la actividad opsónica de la leche mastítica aumenta durante la fase aguda de la inflamación mamaria,

debido a un pasaje masivo de la IgG<sub>2</sub> sanguínea a leche durante las 4-12 horas post-IIM, revirtiendo la proporción IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>2</sub> durante el primer día de inflamación mamaria (Guidry y col., 1983). Se ha observado que los animales que mejor eliminan las IIM no sólo tienen un rápido y masivo reclutamiento de neutrófilos, sino también altos niveles de IgG<sub>2</sub> específica contra el patógeno y una efectiva respuesta inflamatoria temprana que permite el pasaje de estos anticuerpos a la leche antes de la llegada de los neutrófilos (Burston y Erskine, 2003). En un estudio realizado con bovinos de raza Danesa Roja, los animales que presentaban una deficiencia en la producción de IgG<sub>2</sub>, tuvieron una mayor incidencia de enfermedades bacterianas, incluida mastitis, que los animales normales (Jensen y Christensen, 1975). También se ha reportado una significativa correlación entre las concentraciones de IgG<sub>2</sub> en suero y la presencia de mastitis clínicas en vacas Holstein; mientras que estas correlaciones no se observaron para IgG<sub>1</sub>, IgM o IgA (Mallard y col., 1983).

Al igual que la IgM, y en contraste con lo que ocurre en leche humana, la IgA se encuentra presente en bajas concentraciones en leche bovina (Stelwagen y col., 2009). No participa en la opsonización bacteriana, pero tendría funciones en la aglutinación de bacterias invasoras que pueden extenderse y causar infecciones bacterianas en la glándula mamaria y en la neutralización de toxinas (Sordillo y Streicher, 2002).

Lactoferrina: Además de los efectos específicos de los anticuerpos, la glándula mamaria posee factores bacteriostáticos no específicos que pueden actuar en conjunto con las Ig o independientemente de ellas. Uno de estos factores es la lactoferrina, una proteína producida por las células epiteliales y leucocitos cuya función es unirse a los iones de hierro libres en leche, previniendo así el crecimiento de las bacterias que necesitan hierro para su desarrollo (Schanbacher y col., 1993). En la glándula mamaria bovina en lactancia, la concentración de lactoferrina es menor a la observada durante la involución e inflamación de la glándula. Además, los efectos bacteriostáticos de la misma pueden ser inhibidos por la presencia de citrato, un buffer producido por las células epiteliales que transforma al hierro en una forma rápidamente utilizable por las bacterias (Bishop y col., 1976). En consecuencia, se ha sugerido que el principal rol de la lactoferrina en las defensas de la glándula mamaria es proteger contra infecciones, especialmente durante la involución (Sordillo y Streicher, 2002).

Citoquinas: las citoquinas son proteínas solubles que afectan una diversidad de procesos biológicos, incluyendo inflamación e inmunidad. Uno de los mecanismos por los cuales ejercen sus funciones es a través de la activación de mecanismos de transducción de señales

intracelulares y la correspondiente regulación positiva de la expresión génica (Gouwy y col., 2005). A pesar de que las citoquinas juegan un rol fundamental en la respuesta del huésped a la infección, también pueden tener efectos deletéreos sobre el mismo. Por lo tanto, existe un fino balance entre los efectos positivos y negativos de las citoquinas en el huésped, que está establecido por la maduración, cantidad y ubicación de su expresión.

La interleuquina 1 es una citoquina pro-inflamatoria producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos, células epiteliales y endoteliales y fibroblastos (Barksby y col., 2007). Entre sus efectos biológicos en la respuesta inmune innata del huésped a la infección se encuentra la activación de células endoteliales y leucocitos, la inducción de fiebre sistémica y la síntesis de proteínas de fase aguda (Dinarello, 1996). La IL-1 se expresa como 2 proteínas estructural y funcionalmente similares: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Debido a la expresión diferencial de la secuencia señal y el procesamiento proteolítico, la IL-1 $\alpha$  permanece intracelular, mientras que la IL-1 $\beta$  se secreta. Por esto, se postula que la que la IL-1 $\alpha$  sirve predominantemente para regular los eventos intracelulares y mediar la inflamación local, mientras que la IL-1 $\beta$  afecta las respuestas locales e inflamatorias sistémicas. Comparada con otras citoquinas, la respuesta de IL-1 $\beta$  frente a IIM experimentales con *E. coli* ha mostrado ser altamente variable (Riollet y col., 2000a; Bannerman y col., 2004b). En el caso de IIM por bacterias Gram positivas o sin pared celular, la inducción de IL-1 $\beta$  es demorada, en comparación con la infección por bacterias Gram-negativas (Rambeaud y col., 2003; Bannerman y col., 2004a; Kauf y col., 2007). Si bien la producción de ARNm de IL-1  $\beta$  ha mostrado estar regulada positivamente en células de leche aisladas de cuartos mamarios infectados con *S. aureus* (Riollet y col., 2001), se han observado resultados discordantes en cuanto a la detección de la proteína en leche (Riollet y col., 2000a; Bannerman y col., 2004b).

La interleuquina 4 es una glicoproteína producida por linfocitos Th2 maduros, mastocitos y basófilos. Esta citoquina promueve el reclutamiento y activación de mastocitos, actúa sobre células B induciendo la producción de IgG<sub>1</sub> e IgE e impulsa la diferenciación de linfocitos T CD4+ en células productoras de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Brown y Hural, 1997). Estas citoquinas y las Ig IgG<sub>1</sub> e IgE son distintivas de una respuesta Th2, y juegan un rol protector en la inmunidad contra patógenos extracelulares. Estas respuestas también cumplen una función reguladora al controlar los potenciales efectos excesivos de la actividad Th1 en las respuestas inmunes celulares contra patógenos intracelulares y en reacciones autoinmunes (Weiss y Brown, 2001). Existen escasos antecedentes donde se evalúe la regulación de IL-4 y sus funciones biológicas en IIM bovinas. En un estudio realizado en vacas en lactancia infectadas crónicamente con *S. aureus*, no se detectaron aumentos en los niveles de ARNm de esta

citoquinas en células de leche (Riollet y col., 2001).

La interleuquina 10 juega un rol central en la restricción de la reacción inflamatoria e influencia la respuesta inmune adaptativa a la infección. Es producida por linfocitos T CD4+ (Th2), linfocitos B, eosinófilos y mastocitos. Posee un amplio efecto anti-inflamatorio inhibiendo la producción de quemoquinas involucradas en el reclutamiento de monocitos, macrófagos y neutrófilos, y de citoquinas pro-inflamatorias (Moore y col., 2001). En términos de su influencia sobre la respuesta inmune adaptativa, la IL-10 reduce la habilidad de monocitos y macrófagos de presentar antígenos a las células T, mediante la regulación negativa de la expresión de MHC-II (Moore y col., 2001). Además, esta citoquina está involucrada en la alteración del balance Th1/Th2, suprimiendo la producción de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Mocellin y col., 2004). Sin embargo, a medida que los conocimientos sobre IL-10 avanzan, su actividad biológica comienza a entenderse como más compleja; entre otros mecanismos, se ha sugerido que esta citoquina jugaría además un rol directo en la diferenciación de células T CD4+ en células regulatorias (Mocellin y col., 2004). La IIM por *S. aureus* (Bannerman y col., 2004b) o la inyección intra-mamaria de  $\alpha$ -toxina (Riollet y col., 2000b) no induce incrementos detectables de esta citoquina en leche, y se ha observado que, en animales con una alta persistencia de bacterias en leche, la inducción de IL-10 está demorada o ausente (Bannerman y col., 2004 a y b; Kauf y col., 2007). En cambio, las IIM por microorganismos patógenos Gram negativos, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, o *P. aeruginosa*, cuyas infecciones no tienden a la cronicidad, han mostrado inducir incrementos en las concentraciones de IL-10 en leche (Bannerman y col., 2004 a y b). Estas observaciones sugieren que una inducción temprana de IL-10 sería beneficiosa para la habilidad del animal de limitar el crecimiento bacteriano y eliminar al patógeno.

La interleuquina 12 es una citoquina producida principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que actúa como mediador entre la respuesta inmune innata y adaptativa. La forma activa de IL-12 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades: p35 y p40 (Trinchieri, 1995). Esta citoquina actúa en 3 etapas de la resistencia inmune innata y adaptativa en respuesta a una infección: en la infección temprana, la IL-12 producida por las células inflamatorias activadas induce la producción de IFN- $\gamma$  por células T y NK, contribuyendo a la activación de macrófagos y neutrófilos. Luego, la IL-12 y el IFN- $\gamma$  favorecen la diferenciación de los linfocitos T CD4+ activados hacia el fenotipo Th1, induciendo la producción de IFN- $\gamma$  por los mismos. Finalmente, la IL-12 contribuye a una producción óptima de IFN- $\gamma$  y a una proliferación de las células Th1 diferenciadas, en respuesta al antígeno (Trinchieri, 2003). Tanto en células de leche aisladas de bovinos experimentalmente infectados

con *E. coli* o *S. aureus* (Alluwaimi y col., 2003; Lee y col., 2006), como de animales con IIM crónicas por *S. aureus* (Riollet y col., 2001), se observaron incrementos de los niveles de ARNm de esta citoquina. A nivel de proteína, se detectaron incrementos en la concentración de IL-12 en leche de bovinos experimentalmente infectados con *S. aureus* (Bannerman y col., 2004b). Debido a que la IL-12 y el IFN- $\gamma$  inducen una expresión recíproca, las observaciones de que la IL-12 se encuentra aumentada en respuesta a la infección por *S. aureus* es consistente con los reportes de que dicha bacteria induce la expresión de IFN- $\gamma$ .

El Interferón- $\gamma$  es producido por linfocitos y células NK y cumple un rol de nexo entre la inmunidad innata y adaptativa (Schoenborn y Wilson, 2007). Aumenta la actividad microbicida de macrófagos y neutrófilos al favorecer la fagocitosis mediada por receptores, induciendo la actividad de estallido oxidativo y activando la producción de óxido nítrico (Schroder y col., 2004). El IFN- $\gamma$  también regula positivamente la expresión celular de MHC-I, promoviendo la inducción de la inmunidad mediada por células, incrementando la posibilidad del reconocimiento T-citotóxico de los péptidos presentados en la superficie celular (Schroder y col., 2004). Además, actúa sobre los linfocitos B activados induciendo el cambio de la Ig que producen de IgM a IgG<sub>2</sub>, favoreciendo así la producción de anticuerpos con capacidad opsónica (Estes, 1996). Durante el curso de mastitis bovinas experimentales inducidas por *S. aureus* se detectaron incrementos en la concentración de esta proteína en leche, aunque los mismos se observaron de forma más tardía, en comparación a la infección por *E. coli* (Bannerman y col., 2004b). Es interesante destacar que las mayores concentraciones de IFN- $\gamma$  han sido detectadas en IIM caracterizadas por una persistencia de la infección, con un aumento en el número de bacterias recuperadas de la glándula mamaria (Bannerman y col., 2004a; Kauf y col., 2007). Esto puede reflejar un intento del huésped de intensificar las respuestas inmunes mediadas por células para erradicar los patógenos que no son efectivamente eliminados por los mecanismos de defensa innatos del huésped en etapas más tempranas de la infección.

El Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria producida por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales (Angelini y col., 2005). A nivel local, el TNF- $\alpha$  promueve la activación endotelial y el reclutamiento, y posterior activación, de leucocitos al sitio de la infección, mientras que los efectos sistémicos incluyen la inducción de fiebre y de proteínas de fase aguda (Brouckaert y Fiers, 1996). A pesar de que estos efectos locales y sistémicos son beneficiosos para la respuesta innata del huésped frente a la infección, el TNF- $\alpha$  está asociado a respuestas inflamatorias agudas que pueden amenazar la vida del mismo. Durante las mastitis bovinas causadas por bacterias Gram negativas se han detectado concentraciones elevadas de esta citoquina en sangre y leche (Shuster y col., 1997; Riollet y

col., 2000a; Lee y col., 2003; Bannerman y col., 2004b). En cambio, se ha reportado que las bacterias Gram positivas o sin pared celular promueven una respuesta mediada por TNF- $\alpha$  mínima o demorada (Rambeaud y col., 2003; Bannerman y col., 2004a; Kauf y col., 2007). En 2 estudios independientes donde se infectaron glándulas mamarias bovinas con diferentes cepas de *S. aureus*, se observó que las respuestas hacia dicho microorganismo no produjeron aumentos significativos en las concentraciones de TNF- $\alpha$  en leche (Riollet y col., 2000a; Bannerman y col., 2004b). En un trabajo reciente, realizado por técnicas de inmunohistoquímica en glándulas mamarias de vacas en período de involución, se observó un incremento significativo del área inmunomarcada para TNF- $\alpha$ , en los cuartos de animales crónicamente infectados con *S. aureus* (Dallard y col., 2009). A pesar de que aún se desconoce porqué los bovinos con IIM por *S. aureus* no desarrollan una respuesta TNF- $\alpha$  temprana, dicho microorganismo no parecería ser el responsable de la regulación negativa de la citoquina, ya que la infusión de lipopolisacárido en cuartos mamarios infectados con *S. aureus* indujo una producción de TNF- $\alpha$  en concentraciones comparables con las de las infecciones por bacterias Gram negativas (Kauf y col., 2007).

#### **I.1.4. CONTROL**

Los programas actuales de control de mastitis fueron desarrollados en la década del 60 y están dirigidos a disminuir la tasa de nuevas IIM, así como a acortar la duración de las IIM presentes en el rodeo (Neave y col., 1969). Estos programas están basados en la higiene durante el ordeño, incluyendo desinfección de pezones post ordeño, terapia antibiótica durante la lactancia y al inicio del período seco, descarte de vacas con infección crónica y control periódico de la máquina de ordeñar. La aplicación de estas medidas condujo a un progreso considerable en el control de algunos patógenos contagiosos. Sin embargo, las particulares características patogénicas de *S. aureus*, determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y curativas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008), tendiendo a producir infecciones crónicas que ocasionan, en muchos casos, daños permanentes al tejido mamario. La eficacia de curación posterior al tratamiento antibiótico es baja en casos crónicos y no existe una terapia efectiva para eliminar por completo la infección en el animal (Waage y col., 2000). Por consiguiente, se han propuesto alternativas que permitan una mayor reducción de la prevalencia de mastitis, tendiendo a un menor uso de antimicrobianos a los efectos de complementar las medidas de control universalmente aceptadas (Yancey, 1999). Una de ellas es la manipulación de los mecanismos de defensa

específicos del hospedador a través del uso de inmunógenos.

### **I.1.5. VACUNAS**

Antes de discutir cuáles son los blancos de las vacunas y su eficacia, debe mencionarse el objetivo de la vacunación. En ganado lechero, las IIM por *S. aureus* son generalmente subclínicas, siendo la glándula mamaria el reservorio principal del patógeno, el cual se disemina de vaca a vaca fundamentalmente durante el ordeño. Las IIM subclínicas pueden además hacerse crónicas, alterando la leche y causando pérdidas económicas. Entonces, el objetivo de la vacunación contra mastitis por *S. aureus* es la prevención de nuevas IIM, debido a que la enfermedad clínica es poco común mientras que el contagio no lo es (Middleton, 2008).

Un trabajo de revisión realizado en 2011 por Pereira y col., resume las diversas vacunas experimentales destinadas a la prevención de IIM por *S. aureus* ensayadas hasta el momento en modelos bovinos. Mientras que muchas de las vacunas estudiadas parecen estimular una respuesta inmune humoral, la mayoría de ellas no han sido eficientes en la prevención de la infección en el sitio de interés. La falta de éxito de las mismas, puede explicarse en parte, por la complejidad del microorganismo, su habilidad de evadir el sistema inmune del huésped y la falta de respuestas inmunes prolongadas luego de la inmunización. Por lo tanto, la composición final de una vacuna para el control de IIM por *S. aureus* no ha sido aún determinada.

De todos los desarrollos evaluados hasta el momento, sólo algunos alcanzaron la etapa de comercialización, los cuales se describen a continuación.

#### **I.1.5.1. Vacunas comerciales**

La vacuna Lysigin™ (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph MO, EE.UU.) ha sido comercializada en EE.UU. desde la década del 70. Contiene un lisado de 5 cepas capsuladas de *S. aureus* (1 cepa CP5, 2 cepas CP8 y 2 cepas productoras del antígeno 336) (Ma y col., 2004) formuladas con un adyuvante a base de hidróxido de aluminio. Nickerson y colaboradores inmunizaron terneras de 6 meses con la vacuna Lysigin™, seguida de un *booster* a las 2 semanas y 1 un refuerzo cada 6 meses, hasta el momento del parto. Los animales vacunados tuvieron un 45% de reducción de nuevas IIM por *S. aureus* durante la preñez y el parto, relativo a controles sin inmunizar (Nickerson y col., 1999). Frente a estos resultados los autores

sugirieron que la aplicación de múltiples inmunizaciones previas al parto podría ser útil para controlar la aparición de mastitis en vaquillonas, aunque consideraron necesarios la realización de estudios a campo de mayor escala. En un estudio posterior, se inmunizaron vaquillonas preñadas con 2 dosis la vacuna Lysigin™ o con una mezcla de 3 cepas de las incluidas en la vacuna (1 CP5, 1 CP8 y otra 336), o las 5 cepas de la vacuna, formuladas con Al(OH)<sub>3</sub> (Middleton y col., 2006). Los animales se desafiaron a los 6, 7 y 8 días post-parto con una cepa heteróloga (*S. aureus* Newbold 305, CP5). Todos los animales desarrollaron IIM por *S. aureus* post-desafío y no hubo evidencia de curas espontáneas en los animales de ninguno de los grupos. Las vaquillonas inmunizadas con Lysigin™ tuvieron una menor duración de mastitis clínica y una menor severidad de la misma con respecto a los controles, pero no hubo diferencias significativas en los RCS ni en la producción de leche en ninguno de los grupos evaluados. Si bien no hubo evidencia de que la vacuna pudiera prevenir la instauración de nuevas IIM por *S. aureus*, los autores sugieren que la misma sería beneficiosa en reducir la severidad y duración de la manifestación clínica (Middleton y col., 2006). En el año 2007, Luby y colaboradores, caracterizaron por primera vez la respuesta de anticuerpos inducida en vaquillonas preñadas luego de la inmunización con Lysigin™. Los animales inmunizados desarrollaron niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> anti- *S. aureus* CP5, CP8 y 336 en sangre significativamente mayores a los de los animales control. En leche, en cambio, sólo se observaron diferencias significativas en los niveles de IgG anti- *S. aureus* CP8 y 336, mientras que no se registraron niveles detectables de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgM. Finalmente, en el año 2009, Middleton y col., realizaron un ensayo a campo en el cual inmunizaron con Lysigin™ a vacas en lactancia, y observaron la aparición de IIM por *S. aureus* producidas de forma natural. Se observó una baja incidencia de IIM por *S. aureus* durante la experiencia, por lo que el número de cuartos infectados por *S. aureus*, así como el RCS y la producción de anticuerpos específicos no variaron de forma significativa entre animales vacunados y animales control. Esto llevó a los autores a sugerir que los anticuerpos opsonizantes en leche inducidos por la vacunación serían insuficientes para facilitar la fagocitosis y eliminación de *S. aureus* de la glándula mamaria (Middleton y col., 2009).

La segunda vacuna que alcanzó la fase de comercialización es MASTIVAC®, desarrollada en Israel; aunque la misma ya no se encuentra actualmente disponible para la venta. Se compone de un lisado de dos cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis clínicas y subclínicas (una alfa y beta hemolítica y una alfa-hemolítica) obtenido por agitación mecánica y tratamiento con nucleasas, y sobrenadante de cultivo de una tercer cepa (no hemolítica) (Leitner y col, 2003b). En un trabajo inicial con 19 vacas en lactancia, se inmunizó a la mitad de ellas con la vacuna

formulada con adyuvante incompleto de Freund. Luego de un desafío experimental con la cepa no hemolítica, los animales inmunizados presentaron una menor proporción de cuartos infectados, respecto de los controles (35% vs 90,5%;  $p < 0,01$ ), y un menor RCS. Las evaluaciones histopatológicas de los cuartos de animales inmunizados mostraron una leve infiltración de linfocitos, sólo en aquellos cuartos que presentaron infección por *S. aureus* post-desafío; mientras que todos los cuartos control (incluso aquellos de los cuales no se aisló *S. aureus*) exhibieron una ligera reacción inflamatoria supurativa e infiltrado de linfocitos (Leitner y col, 2003a). En un ensayo a campo posterior en el que se utilizaron 452 vaquillonas Holstein preñadas, la aplicación de 2 dosis de vacuna indujo la producción de anticuerpos específicos en sangre de las vaquillonas inmunizadas, significativamente mayores que los hallados en los animales control. Si bien el ensayo se realizó en establecimientos que presentaban una prevalencia de 8-25% de *S. aureus*, un número muy reducido de animales presentaron infección por *S. aureus* durante el período de estudio, por lo que no pudo evaluarse estadísticamente la protección específica estimulada por la vacuna (Leitner y col., 2003c).

La última vacuna liberada recientemente al mercado es Startvac® (Laboratorios Hipra, S.A. autorizada por la Agencia Europea de Medicamentos – EMA). La misma está compuesta por un lisado de una cepa de *S. aureus* productora de biofilm, formulada con un adyuvante de base oleosa. En un estudio reciente, la inmunización de vaquillonas preñadas con dicha formulación indujo la estimulación de respuestas humorales con alta producción de IgG, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> en sangre e IgG en leche. Además, los animales inmunizados presentaron menores recuentos de bacterias y menor severidad en la sintomatología clínica luego de una IIM experimental con una cepa heteróloga de *S. aureus* (Prenafeta y col., 2010). Sin embargo, no existen estudios de eficacia realizados a campo que evalúen esta vacuna y hayan sido publicados en revistas con referato.

### **I.1.5.2. Adyuvantes**

Los adyuvantes pueden ser definidos funcionalmente como componentes agregados a las formulaciones de vacunas para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos *in vivo*. Según sus características, los adyuvantes pueden acelerar la generación de respuestas inmunes robustas, sostener las repuestas por períodos de tiempo más prolongados, inducir respuestas locales en mucosas, generar anticuerpos con aumentada avidéz y capacidad de neutralización, desarrollar respuestas mediadas por linfocitos T citotóxicos, aumentar las respuestas en individuos con sistemas inmunes débiles, y reducir la cantidad de antígeno necesaria en las formulaciones, permitiendo disminuir los costos de los programas de vacunación (Pashine y

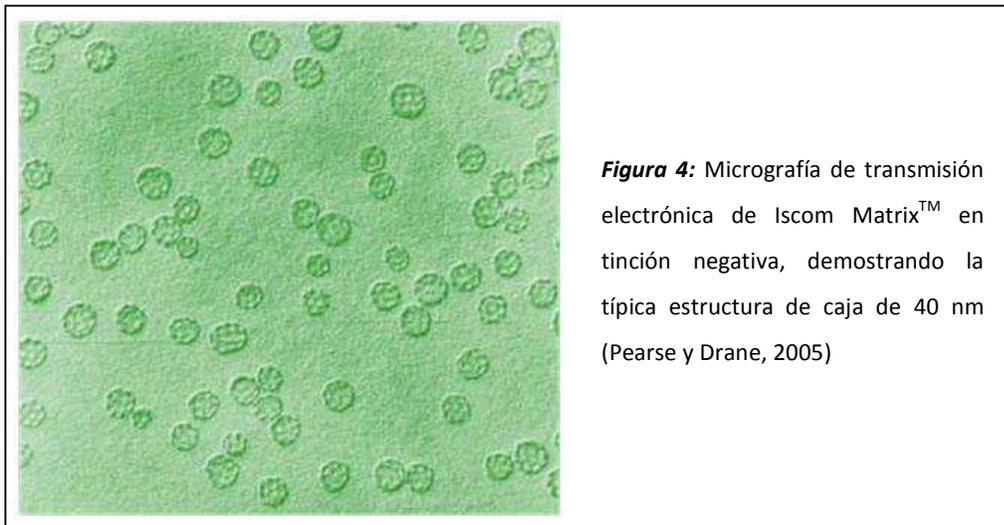
col, 2005).

Los adyuvantes pueden dividirse en 2 categorías, según sus mecanismos de acción predominantes. Los inmuno-potenciadores, que activan la inmunidad innata (por ejemplo citoquinas o componentes bacterianos), y los sistemas de *delivery* (sales minerales, emulsiones, liposomas), que concentran y exponen los antígenos en patrones repetitivos, los direccionan hacia las células presentadoras de antígenos y ayudan a co-localizar al antígeno con el inmuno-potenciador (O' Hagan, 2004). El adyuvante clásico utilizado hasta el momento en vacunas veterinarias y aceptado internacionalmente por las agencias reguladoras debido a su probada inocuidad es el  $Al(OH)_3$ . Sin embargo, entre las limitantes de las sales de aluminio se encuentran su débil efecto adyuvante con ciertos antígenos vacunales y la inhabilidad de inducir respuestas inmunes mediadas por células o respuestas de células T citotóxicas (HogenEsch, 2002). El gran avance realizado en los últimos años en el diseño de vacunas ha llevado al desarrollo de nuevos adyuvantes con propiedades inmunoestimulantes y eficientes a su vez como vehículos. Los complejos inmunoestimulantes o ISCOMs son uno de ellos, y se describen en detalle a continuación.

### ***Complejos inmuno-estimulantes.***

Los complejos inmuno-estimulantes, ISCOMs, son un sistema adyuvante de nueva generación desarrollado por Morein y col. (1984). Estos consisten en partículas esféricas con carga negativa, y estructura de caja, de aproximadamente 40 nm, compuestos por saponinas, colesterol y fosfolípidos, unidos entre sí mediante interacciones hidrofóbicas. En la tecnología clásica de vacunas de tipo ISCOM se requiere que el antígeno sea incorporado dentro de la partícula del adyuvante (Morein y col., 1984), lo que no solo presenta la desventaja de restringir el tipo de antígeno que puede utilizarse a proteínas con áreas hidrofóbicas, sino que además consiste en un proceso complejo de difícil control. Es así como posteriormente se desarrolla Iscom Matrix<sup>TM</sup>, como adyuvante particulado preparado con los mismos componentes y la misma estructura que los ISCOMs, pero sin antígeno. De esta forma, las formulaciones pueden lograrse mediante el simple agregado del adyuvante a la suspensión que contiene el antígeno, lo que permite obtener vacunas con la misma capacidad de presentación antigénica y propiedades inmunomoduladoras de los ISCOMs, pero con un rango más amplio de aplicación (Morein y Bengtsson, 1999). Estos complejos han mostrado ser efectivos tanto en el *delivery* de antígenos como en la estimulación del sistema inmune, por lo que son considerados como sistemas adyuvantes integrados (Morelli y col., 2012). La principal diferencia entre estos complejos y otros sistemas de *delivery*, como liposomas o

micropartículas, es el rol de las saponinas, las cuales son esenciales para la formación y el mecanismo de acción de los ISCOMs (Sjölander y col., 1998).



Estudios realizados en diferentes modelos animales permitieron una mejor comprensión de los mecanismos de acción de estos complejos. Estos incluyen la activación de aspectos de la inmunidad innata dependientes de IL-12, y la habilidad de inducir la presentación antigénica por ambas vías MHC-I y II, y la producción de citoquinas relacionadas. Estos eventos crearían un ambiente óptimo para la maduración de células presentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas, aumentando su habilidad de presentar antígenos y expresar señales co-estimuladoras que facilitan la subsecuente amplificación de la respuesta inmune antígeno-específica (Sun y col., 2009). También se ha observado que las vacunas de tipo ISCOM o Iscom Matrix™ circulan rápidamente hacia los ganglios linfáticos dentro de las 2 horas posteriores a la inoculación, donde son captadas por las células dendríticas residentes. Posteriormente (24-48 horas), las células dendríticas y APCs presentes en el sitio de inoculación también se dirigen a los ganglios linfáticos cargando los antígenos capturados; por lo que la combinación de estos 2 mecanismos resultaría en una presentación antigénica rápida y prolongada (Morelli y col., 2012).

Se ha observado que los complejos inmunoestimulantes son fuertes inductores de respuestas humorales, así como de respuestas celulares y citotóxicas, habilidad que adquirirían mediante la inducción de mediadores innatos y adaptativos, de procesos celulares y de la interacción entre ellos (Pearse y Drane, 2004). Si bien los detalles de este complejo proceso no han sido aún dilucidados, la expresión de un amplio rango de citoquinas (IL-1, IL-2, L-4, IL-5, IL-

6, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ ), así como de diferentes subclases de inmunoglobulinas (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>) inducidas por vacunas de tipo ISCOM o Iscom Matrix<sup>TM</sup> en diferentes modelos de ratón, serían consistentes con la inducción de respuestas Th1/Th2 balanceadas (Sjolander y col., 1998; Sjolander y col., 2001). El acceso a la vía MHC-I de presentación antigénica, es crítica para la habilidad de los complejos inmuno-estimulantes de inducir repuestas inmunes citotóxicas. Si bien no se conoce detalladamente el mecanismo por el cual esta respuesta se produciría, se ha propuesto que las saponinas ejercerían su acción en la disrupción de las membranas de las APCs permitiendo el escape endosomal del antígeno y su posterior liberación al citosol (Pearse y Drane., 2004).

En el año 2009, Sun y col., revisaron las vacunas formuladas hasta el momento con ISCOMs o Iscom Matrix<sup>TM</sup> evaluadas tanto en animales de laboratorio como en humanos. Estas incluyen, en su mayoría, proteínas virales, aunque también estos complejos han sido utilizados para la formulación de antígenos bacterianos o parasitarios. En todos los casos, las formulaciones han mostrado ser seguras y altamente inmunogénicas, incluyendo respuestas humorales y mediadas por células, así como respuestas innatas (Sun y col., 2009). Las características claves de las vacunas de tipo ISCOM o Iscom Matrix<sup>TM</sup> en las respuestas humorales son el incremento en la magnitud, rapidez y duración de la respuesta, así como la capacidad de reducir la dosis de antígeno presente en la formulación. En cuanto a las respuestas celulares, su particularidad radica en la habilidad de inducir fuertes respuestas T CD4+ y CD8+, y respuestas T citotóxicas duraderas (Pearse y Drane 2004). Estas propiedades, sumado a la simpleza y reproducibilidad en la fabricación de Iscom Matrix<sup>TM</sup>, lo convierten en un adyuvante ideal para la formulación de vacunas que requieran una rápida respuesta, o en las cuales el antígeno es limitado o difícil de obtener, permitiendo además reducir los costos de manufactura.

## I.2. OBJETIVOS

❖ **Objetivo general:** Desarrollar un prototipo de vacuna contra mastitis bovinas causadas por *Staphylococcus aureus*.

❖ **Objetivos parciales:**

1. Comparar las respuestas inmunes generadas en bovinos por bacterinas de *S. aureus* preparadas a partir de cepas productoras de Polisacárido Capsular, formuladas con un adyuvante tradicional y un adyuvante de nueva generación.

2. Clonar y expresar la  $\beta$ -toxina de *S. aureus*.

3. Comparar las respuestas inmunes generadas en bovinos por una bacterina y un lisado de *S. aureus* formulados con el adyuvante seleccionado, contra los antígenos vacunales y contra subunidades antigénicas.

4. Construir una vacuna prototípica que incluya componentes obtenidos en el laboratorio, formulada con el adyuvante seleccionado. Inmunizar bovinos con la vacuna prototípica y evaluar la respuesta inmune humoral y celular, así como la funcionalidad de los anticuerpos, inducida por la vacunación.

## CAPÍTULO II. ENSAYO I DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS: EVALUACIÓN DE ADYUVANTES

### II.1. MARCO TEÓRICO

La fagocitosis por neutrófilos se considera una de las principales líneas de defensa contra microorganismos patógenos en la glándula mamaria (Paape y col., 2003). Sin embargo, la actividad fagocítica de los PMN disminuye debido a la reducción de las reservas de energía durante la diapédesis a través del epitelio mamario y la ingestión de grasas y caseína al entrar a la glándula mamaria (Paape y col., 2003). La utilización de inmunógenos con el objetivo de incrementar las defensas de la glándula mamaria bovina, apunta a mejorar la actividad fagocítica de los PMN, aumentando los títulos de anticuerpos opsonizantes en las secreciones mamarias, especialmente de subclase IgG<sub>2</sub> (O'Brien y col., 2001; Tollersrud y col., 2001; Middleton, 2008), y a estimular las respuestas citotóxicas, capaces de alcanzar las bacterias intracelulares (Wallemacq y col., 2012).

La mayor parte de las cepas de *S. aureus* producen polisacáridos capsulares (CP) que enmascaran los anticuerpos dirigidos contra componentes de la pared celular e impiden el mecanismo de activación por complemento (O'Brien y col., 2001; Paape y col., 2003). Sin embargo, los anticuerpos dirigidos contra los CP son capaces de opsonizar *S. aureus*, favoreciendo la fagocitosis por neutrófilos (Karakawa y col., 1988; O'Brien y col., 2001). Los CP5 y 8 han sido identificados en *S. aureus* aislados de infecciones bovinas y humanas en el mundo (Han y col., 2000; Tollersrud y col., 2000; O'Riordan y Lee 2004; Verdier y col., 2007). En un estudio reciente realizado en nuestro laboratorio, más del 50 % de las cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovinas en Argentina fueron genotipadas como CP5, y de ellas, la mitad, fueron capaces de producir CP *in vitro* (Camussone y col., 2012). La alta prevalencia de los CP de *S. aureus* en cepas causantes de mastitis bovinas, así como sus características anti-fagocíticas, han convertido a estos componentes en importantes blancos de interés para el diseño de vacunas contra mastitis estafilocócicas (Gilbert y col., 1994; Guidry y col., 1994; Giraudo y col., 1997; Tollersrud y col., 2000; O'Brien y col., 2001; Lee y col., 2005). Entre éstas, las formuladas sobre la base de bacterinas de cepas capsuladas han mostrado cierta efectividad en la reducción de la incidencia de IIM subclínicas y la severidad de las mastitis clínicas en ensayos de desafíos experimentales y a campo; sin embargo, ninguna de estas formulaciones evaluadas han podido prevenir completamente la instauración de nuevas IIM en ganado lechero (Middleton, 2008; Pereira y col., 2011). Estas observaciones señalan la

necesidad de explorar nuevas alternativas para mejorar el desempeño de las bacterinas actualmente disponibles.

La naturaleza del adyuvante utilizado en la formulación, ha sido identificada como un factor crítico para el aumento de la eficacia de las vacunas. Diversos adyuvantes y sistemas de *delivery* de antígenos en inmunógenos experimentales dirigidos contra mastitis estafilocócicas han sido evaluados (O'Brien y col., 2001; Tollersrud y col., 2001; Hu y col., 2003; Cui y col., 2010). Sin embargo, las formulaciones disponibles comercialmente incluyen adyuvantes tradicionales. La vacuna comercial para *S. aureus* más estudiada (Lysigin™, Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc), ha sido formulada con Al(OH)<sub>3</sub>; mientras que otra vacuna recientemente liberada al mercado ha sido formulada con un adyuvante de base oleosa (Startvac®, Laboratorios Hipra, S.A.). Los complejos inmuno-estimulantes, ISCOMs, son un nuevo tipo de sistema adyuvante compuestos por saponinas, colesterol y fosfolípidos, que formulan antígeno y adyuvante en la misma nanopartícula (Morein y col., 1984). Estos complejos no sólo son eficientes como vehículos, sino que además son capaces de producir una respuesta humoral/celular balanceada, mediante la inducción de múltiples mediadores innatos y adaptativos (Pearse y Drane, 2004). Por su parte, la matriz del ISCOM, Iscom Matrix™ se utiliza como adyuvante particulado en una entidad separada del antígeno, presentando la ventaja de simplemente tener que ser agregado a la suspensión del antígeno para lograr la formulación (Morein y col. 2007b). En un trabajo de revisión reciente, donde se resume la diversidad de vacunas experimentales basadas en antígenos definidos y formuladas con Iscom Matrix™ ensayadas hasta el momento, se muestra el fuerte poder inductor de respuesta de anticuerpos y de inmunidad celular de este adyuvante, en variadas especies animales (Sun y col., 2009).

## II. 2. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Considerando que no existen estudios previos acerca del uso de Iscom Matrix™ en vacunas de células enteras y que las vacunas disponibles comercialmente para el control de mastitis por *S. aureus* han sido formuladas sobre la base de adyuvantes tradicionales, se planteó como primer objetivo del trabajo de tesis comparar las respuestas inmunes innata y humoral generadas al inmunizar vaquillonas preñadas con una bacterina de *S. aureus* productora de CP5, formulada con un adyuvante tradicional y con Iscom Matrix™.

- **Objetivos específicos**

1. Inmunizar vaquillonas preñadas con una bacterina de *S. aureus* productora de CP5, formulada con Al(OH)<sub>3</sub> y con Iscom Matrix™.

2. Evaluar la respuesta inmune innata y humoral específica desarrollada por ambas formulaciones.

3. Evaluar la funcionalidad de los anticuerpos generados para reconocer y favorecer la fagocitosis de *S. aureus* por neutrófilos bovinos.

## **II.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **II.3.1. INMUNIZACIÓN Y MUESTREO**

#### **II.3.1.1. Cepas de *S. aureus***

Se utilizó la cepa de *S. aureus* Reynolds, considerada como cepa de referencia productora de CP5, aislada de cultivos de sangre en el Kaiser Permanent Hospital, North Hollywood, California (Karakawa y col., 1982) y gentilmente cedida por el Dr. B. Poutrel (INRA Nouzilly, Francia). La selección de la misma se realizó sobre la base de resultados previos obtenidos en el laboratorio, en los cuales, dicho tipo capsular fue identificado como el más prevalente entre las cepas productoras de IIM en nuestra región (Camussone y col., 2012).

Para períodos cortos de conservación de las bacterias, se realizaron cultivos en estría en Agar Base con 5% de sangre de ternero, y se mantuvieron a 4°C. Para conservar las cepas durante mayores períodos de tiempo, a partir de una colonia aislada se sembró en caldo Tripteína Soya, incubándose toda la noche a 37°C. Se transfirieron 750 µl del cultivo a un criovial de 2 ml que contenía un volumen igual de Tripteína Soya suplementado con glicerol 15% (v/v). Se mezcló y conservó a -70°C (Sambrook y col., 1989).

#### **II.3.1.2. Preparación de bacterina de *S. aureus***

*Staphylococcus aureus* Reynolds se cultivó en Agar Salado durante toda la noche a 37°C, para favorecer la expresión de cápsula (Fattom y col., 1990). Luego el cultivo se resuspendió en PBS estéril y se inactivó con 0,5% de formalina por 24 horas a 37°C. Se realizaron 3 lavados mediante centrifugaciones de 10 minutos a 5.000 rpm para eliminar el exceso de formol. Finalmente el pellet de células se resuspendió en PBS estéril a concentración final de  $1.10^9$  ufc/ml.

#### **II.3.1.3. Formulación de las vacunas**

Una vez obtenido el inmunógeno se formuló, según correspondiera, con dos adyuvantes diferentes: Al(OH)<sub>3</sub> (Alhydrogel™; Biogénesis Bagó) o Iscom Matrix™ (Isconova), gentilmente cedidos por la Dr. M. Vena y el Dr. B. Morein, respectivamente. Para el caso de Al(OH)<sub>3</sub>, el mismo se agregó a la suspensión bacteriana a una concentración final de 15%, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación a 100 rpm para permitir la adsorción entre gel y microorganismo. Para el caso de Iscom Matrix™ se agregaron 2mg/ml del mismo a

la suspensión y se mezcló por inversión. Todas las preparaciones fueron sometidas a controles de esterilidad mediante la siembra de 100 µl de las mismas en placas de Agar Sangre e incubación por 48 horas a 37°C. Las preparaciones se conservaron en heladera hasta su utilización, por no más de 72 horas.

#### **II.3.1.4. Animales**

Se utilizaron 27 vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación, pertenecientes al Tambo Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA. Se incluyeron 6 animales por grupo para detectar diferencias significativas en la producción de anticuerpos, expresado como Densidad Óptica (DO), de 0,75 (SD 0,4) entre grupos vacunados, respecto de los controles, con un nivel de significancia de 5% y un poder estadístico de 80%. Considerando la posibilidad de la eliminación de hasta tres animales por grupo, en caso que no cumplieran los criterios de inclusión preestablecidos, se conformaron grupos de 9 vaquillonas cada uno.

Los animales se mantuvieron alimentados con pasturas a base de alfalfa suplementada con grano de maíz desde los 60 hasta los 30 días previos al parto. Luego, se alimentaron con una ración totalmente mezclada (TMR por su sigla en inglés) basada en silo de maíz hasta el parto. Desde ese momento recibieron TMR suplementada con silo de maíz bajo condiciones de pastoreo (alfalfa). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigaciones Agropecuarias y Enseñanza (FASS, 1999).

#### **II.3.1.5. Inmunización y muestreo**

Los animales seleccionados se dividieron al azar en 3 grupos (n=9) y cada uno de ellos recibió una de las siguientes formulaciones:

*Grupo Control:* 1 ml de solución fisiológica estéril/dosis

*Grupo Iscom Matrix:* (1.10<sup>9</sup> ufc de *S. aureus* + 2 mg Iscom Matrix<sup>TM</sup>)/dosis

*Grupo Al(OH)<sub>3</sub>:* (1.10<sup>9</sup> ufc de *S. aureus* + 15% v/v Al(OH)<sub>3</sub>)/dosis

Se aplicaron dos inyecciones subcutáneas en el área del ganglio supramamario de acuerdo con descripciones previas (Camussone y col., 2010), 45 y 15 días previos a la fecha estimada de parto. Al momento de la segunda dosis vacunal las glándulas mamarias de todos los animales incluidos en el experimento se examinaron clínicamente por palpación y se tomaron muestras de secreción pre-parto para determinar la presencia de IIM por *S. aureus*. Las muestras fueron

recolectadas en forma aséptica siguiendo procedimientos estándar (Oliver y col., 2004) y luego del muestreo los pezones de las vaquillonas se sumergieron en una solución antiséptica conteniendo 0,5% de yodo disponible. Solo se incluyeron en el ensayo a vaquillonas libres de IIM por *S. aureus* y sin signos clínicos de inflamación.

Antes del comienzo del protocolo de inmunización se colectó una muestra de sangre por punción en la vena coccígea, lo cual se repitió cada 15 días hasta el día del parto. Dentro de las 24 horas post-parto se tomaron muestras de sangre y de leche de cada cuarto mamario, lo cual se repitió a los 7, 15, 21, 30 y 60 días (Tabla 1). Una alícuota de leche de cada cuarto mamario fue utilizada para cultivo bacteriológico. Quinientos µl de leche de cada cuarto mamario de las muestras obtenidas a partir del día 7 post-parto se utilizaron para la preparación de muestras compuestas para determinación de anticuerpos. Estas muestras se centrifugaron por 15 minutos a 10.000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras de sangre se dejaron coagular mediante incubación a temperatura ambiente y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 1.500 rpm por 10 minutos. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. Se determinó la aparición de reacciones adversas al inmunógeno a través de la observación clínica periódica.

Días / Tratamiento	-45	-30	-15	0 (parto)	7	15	30	60
Dosis de vacuna	1 <sup>era</sup>		2 <sup>da</sup>					
Muestras de sangre	x	x	x	x	x	x	x	x
Muestras de leche			x	x	x	x	x	x

**Tabla 1.** Esquema de inmunización y muestreo de sangre y leche de vaquillonas seguido en el ensayo a campo.

### II.3.1.6. Análisis bacteriológico de muestras de leche

Para cada una de las instancias de muestreo, se tomaron 10 µl de las muestras obtenidas de cada cuarto mamario de todos los animales en ensayo y se sembraron en un cuadrante de placa de cultivo con Agar Sangre. Las mismas se incubaron 18 horas a 37°C para detectar la presencia de organismos de crecimiento rápido. En caso de no observarse desarrollo, se re-incubaron por otras 24 horas (Oliver y col., 2004). La presencia de una colonia de *S. aureus* en Agar Sangre se consideró como identificación positiva; con lo cual el límite de detección fue de 100 ufc/ml. Las vaquillonas que arrojaron un cultivo positivo en cualquier muestra a lo largo del estudio fueron excluidas del mismo.

La caracterización de los microorganismos aislados se realizó mediante observación microscópica y sobre la base de reacciones bioquímicas clásicas:

- *Tinción de gram*

Se realizó un examen microscópico (100X) de extendidos de diferentes colonias coloreados con la tinción de Gram (modificación de Hütter).

- *Observación del patrón de hemólisis*

La producción de las hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$  se observó luego de 24 horas de cultivo en Agar Sangre como una estrecha zona transparente de hemólisis completa ( $\alpha$ ) o una amplia zona de hemólisis incompleta ( $\beta$ ).

- *Prueba de la coagulasa (en tubo de ensayo)*

Se colocaron 200  $\mu$ l de plasma de conejo estéril en un tubo de hemólisis estéril. Se introdujeron de 2 a 3 colonias puras de un cultivo en placa y se resuspendió por agitación. Se incubó a 37°C y se observó coagulación a las 4, 8 y 24 horas.

Interpretación de los resultados:

Prueba (+): se forma un coágulo o filamentos de fibrina definidos que ocupa parcial o totalmente el volumen de plasma.

Prueba (-): no hay formación de coágulo, la suspensión se mantiene homogénea.

- *Prueba de la catalasa (Método del porta objetos)*

Se recogió el centro de una colonia pura de un cultivo en placa con una aguja de inoculación y se colocó en un portaobjetos de vidrio limpio. A continuación se agregó sobre las bacterias una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%.

Interpretación de los resultados:

Prueba (+): formación inmediata de burbujas bien visibles por la liberación de O<sub>2</sub>.

Prueba (-): no hay formación de burbujas (no se forma O<sub>2</sub>).

### **II.3.2. OBTENCIÓN DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR TIPO 5 DE *S. aureus*.**

Se cultivó *S. aureus* Reynolds en placas de Agar Sangre durante toda la noche a 37°C. Una colonia aislada de dicho cultivo se repicó en placas de Agar Salado, incubando toda la noche a 37°C. Las bacterias se cosecharon con 5 ml de PBS y se agitaron con agitador magnético durante 90 minutos. Luego se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 rpm a 10°C y se

conservó el sobrenadante. El mismo se llevó a 80°C en baño de agua durante media hora y posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm a 10°C durante 30 minutos. Se agregó etanol al sobrenadante en proporción 80% (v/v) y se estacionó toda la noche a -20°C. Transcurrido dicho tiempo se centrifugó a 10.000 rpm a 10°C durante 30 minutos y se conservó el pellet. El mismo se disolvió en un volumen mínimo de etanol frío al 80% (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada y se estacionó a -20°C por 30 minutos. Se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm durante 30 minutos a 10°C y se disolvió el pellet en un volumen mínimo de PBS. Luego, se incubó con 0,1mg/ml de Proteinasa K (Promega) durante toda la noche a 37°C en agitación, para eliminar los restos de proteínas. La enzima se inactivó por shock térmico a 80°C por 30 minutos. Por último se incubó con 10,7mg/ml de Peryodato de Sodio (Cicarrelli) durante 45 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con etilenglicol al 20% (v/v) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 10°C. El sobrenadante se transfirió a bolsas de diálisis (corte 30 kDa) y se dializó contra H<sub>2</sub>O destilada durante 48 horas con recambio de agua cada 3 horas. El producto se almacenó a -20°C (Raffaelli, 2009).

La concentración de polisacárido purificado se determinó mediante el método de Dubois y col. (1956) del fenol-sulfúrico, modificado por Cuesta (2003). En placas de 96 pocillos con fondo plano se sembraron 40 µl de muestra más 40 µl de una solución de fenol al 5%. Luego de homogeneizar se agregaron 200 µl de ácido sulfúrico y se incubó durante 30 minutos a 80°C. Se leyó la DO a 490 nm (Infinite® F50, Tecan) y se calculó la concentración de polisacárido mediante comparación con una curva de concentraciones conocidas de sacarosa.

### **II.3.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

#### **II.3.3.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)**

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano (GBO) con una suspensión de  $1.10^8$  ufc de *S. aureus* Reynolds inactivado con formol o 5 µg de CP5 purificado (Ver sección II.2.4.), ambos resuspendidos en PBS (pH 7,2). Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora y a continuación se bloquearon con solución de bloqueo durante 30 minutos a 37°C. Luego de tres lavados de 1 minuto con PBS-Tween se incubaron a 37°C durante 1 hora con las muestras de sangre o leche diluidas en PBS suplementado con 1% de leche de cabra descremada. Transcurrida la incubación, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS-Tween y seguidamente las placas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios diluidos en PBS suplementado con 1% de leche de cabra descremada. Para la determinación de IgG, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa alcalina (Sigma) durante

45 minutos a 37°C. Luego de ese tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-Tween y se incubaron las placas con la solución de sustrato/cromógeno TMB (Pierce) durante 5 minutos. Para el caso de la determinación de IgG<sub>2</sub>, en un primer paso se incubaron las placas con un anticuerpo monoclonal anti-IgG<sub>2</sub> bovina obtenido en ratón (Sigma) durante 1 hora a 37°C. Transcurrida dicha incubación, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS-Tween y se incubó durante 45 minutos a 37°C con un anticuerpo anti-IgG de ratón (Jackson). Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween y se incubaron las placas con la solución de sustrato/cromógeno TMB (Pierce) durante 5 minutos. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5N y se leyó la DO a 450 nm en un lector de microplacas (Infinite® F50, Tecan). La confirmación de la ausencia de anticuerpos contra *S. aureus* en la leche de cabra descremada fue realizada por ELISA, utilizando la solución de bloqueo (PBS + leche de cabra al 5%) como una muestra. Los valores de DO para esta solución fueron menores que los de los controles negativos.

Para el análisis comparativo de las respuestas de anticuerpos de los diferentes grupos de tratamiento a través del tiempo, se utilizó un diseño con datos recogidos en una secuencia de puntos espaciados en el tiempo en forma desigual, empleándose un modelo factorial para los factores tratamiento y tiempo. Las medias de DO obtenidas en el test de ELISA para IgG e IgG<sub>2</sub> de los diferentes grupos de tratamiento, fueron comparadas en cada estación de muestreo por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por el test de Mann-Whitney para detectar diferencias entre pares ( $p < 0,05$ ).

### **II.3.3.2. Ensayos de fagocitosis para la evaluación de la capacidad opsónica de los anticuerpos**

#### **II.3.3.2.1. Marcación de las bacterias.**

Se cultivó *S. aureus* Reynolds en Agar Salado toda la noche a 37°C. Las bacterias se resuspendieron en PBS y se centrifugaron 3 minutos a 10.000 rpm. Luego se resuspendieron en 1 ml de FITC/NaCO<sub>3</sub> y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS hasta obtener un sobrenadante limpio. Finalmente se resuspendieron en solución de fagocitosis hasta concentración de 1.10<sup>8</sup> ufc/ml.

#### **II.3.3.2.2. Purificación de los neutrófilos bovinos**

Se extrajeron 50 ml de sangre bovina de un animal sano y que no haya sido incluido en el ensayo de inmunización, mediante punción de vena yugular y se transfirieron a un tubo plástico conteniendo 5 ml de EDTA 1%. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 1.400

rpm. Luego de la centrifugación y utilizando una pipeta plástica se removió el plasma y la fracción leucocitaria. A la capa de glóbulos rojos presente en el fondo del tubo se le agregó 50 ml de solución de lisis y se incubó durante 10 minutos en hielo. La reacción se detuvo con 50 ml de PBS y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 1.400 rpm. El pellet celular se resuspendió en 9 ml de PBS, se transfirió a un tubo conteniendo 3 ml de Histopaque 1083 (Sigma) y se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 2.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de neutrófilos con 10 ml de PBS. El pellet de células se resuspendió en 1 ml de solución de fagocitosis y se realizó el recuento y la determinación de la viabilidad celular mediante exclusión con Azul de tripán en cámara de Neubauer. Finalmente las células se diluyeron en solución de fagocitosis hasta concentración  $1.10^7$  cel/ml.

#### ***II.3.3.2.3. Ensayo de fagocitosis***

Se utilizaron los sueros obtenidos al día 7 post-parto para cada uno de los grupos evaluados. Se utilizaron placas estériles de 24 pocillos con fondo plano (Nunc). Cien  $\mu$ l de la suspensión de bacterias/FITC ( $1.10^7$  ufc) y 300  $\mu$ l de solución de fagocitosis se sembraron en cada pocillo. Se agregaron 5  $\mu$ l de los sueros a evaluar y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión de neutrófilos ( $1.10^6$  cél.) y se incubó por otros 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo se frenó la reacción con 500  $\mu$ l de solución de “stop” fría. El contenido de cada pocillo se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm. Las muestras se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS-BrEt y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 1.400 rpm para eliminar los restos de BrET y se resuspendieron los pellets en 500  $\mu$ l de solución de citometría suplementado con 1% de formol. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Se utilizaron como controles bacterias opsonizadas sin neutrófilos, neutrófilos sin bacterias, y neutrófilos con bacterias sin anticuerpos. Las muestras se conservaron a 4°C por 1 mes hasta su lectura.

#### ***II.3.3.2.4. Citometría de flujo:***

Se adquirieron 50.000 eventos en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba). La región 1 (R1), conteniendo a los PMN, se seleccionó teniendo en cuenta los parámetros de tamaño Vs complejidad citoplasmática. La intensidad de fluorescencia sobre R1 se graficó en histogramas

de escala logarítmica. Los datos se analizaron con el programa WinMDI. Se calculó el porcentaje de PMN con bacterias internalizadas y se utilizó el parámetro de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) como una estimación del número de bacterias internalizadas por neutrófilo positivo.

#### **II.3.3.2.5. Análisis estadístico**

Las medias de los porcentajes de neutrófilos positivos, o IMF para cada grupo de tratamiento, fueron comparadas, en caso de comprobarse los supuestos de normalidad de la distribución (Kolmogorov Smirnov) y homogeneidad de varianzas (Levene), por medio de análisis de la varianza para muestras repetidas (ANOVA), seguido por el test de Duncan en caso de obtener diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En los casos donde no se comprobaron los supuestos del ANOVA, las diferencias se analizaron mediante Kruskal Wallis, seguido por test de Mann Whitney para detectar diferencias entre pares ( $p < 0,05$ ).

### **II.3.4. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CITOQUINAS EN ANIMALES INMUNIZADOS**

#### **II.3.4.1. Toma de muestras**

Se tomaron 5 ml de sangre de vena yugular de todos los animales vacunados, 24 horas después de aplicada la segunda dosis de vacuna. La misma se transfirió a tubos estériles conteniendo 500  $\mu$ l de EDTA 1% y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 20 minutos a 1.000 rpm, luego de lo cual el plasma y la fase leucocitaria se transfirieron a un tubo limpio. Se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 1.500 rpm, el plasma se pasó a otro tubo y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El pellet de células se resuspendió en 500  $\mu$ l de TRizol Reagent (Invitrogen) y se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **II.3.4.2. Extracción de ARN total**

El ARN total fue extraído según protocolo del fabricante (Invitrogen). Antes de comenzar con la extracción se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se agregaron 100  $\mu$ l de cloroformo, se agitó durante 15 segundos y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 10.000 rpm, luego de lo cual se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se agregaron 250  $\mu$ l de alcohol isopropílico, se mezcló por inversión y se incubó otros 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente durante 10

minutos a 4°C a 10.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de etanol 75% y se agitó en vortex por 15 segundos. Se centrifugó a 7.000 rpm por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Gibco). Las muestras se conservaron a -80°C.

El ARN se cuantificó midiendo la Abs. a 260 nm en espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), y se evaluó la pureza del mismo mediante la determinación de la relación de Abs. 260/280.

#### **II.3.4.3. Transcripción reversa del ARN**

Se procedió según instrucciones del fabricante (Fermentas). Un µg de ARN total de cada muestra se mezcló con 0,2 µg de Primers Random (Biodynamics) y se incubó a 65°C por 5 minutos. Transcurrida la incubación se enfrió rápidamente la mezcla y se agregaron 4 µl de buffer de reacción 5X (Fermentas), 1 mM de dNTPs (Productos Bio-lógicos), 20 U de inhibidor de proteasas (Fermentas), y 200 U de MMLV transcriptasa reversa (Fermentas). La mezcla se sometió al siguiente ciclo de temperaturas en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer): 10 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C y 10 minutos a 70°C. Los ADNc obtenidos se conservaron a -20°C hasta su uso.

#### **II.3.4.4. PCR en Tiempo Real**

Se cuantificaron los niveles ARNm de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12 p-40, IFN-γ y TNF-α, utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 2). Los oligonucleótidos para la amplificación del IFN-γ se diseñaron sobre la base de la secuencia reportada en GenBank (Nº Acceso NM\_174086) con el programa Primer Blast. El resto de las citoquinas se amplificaron con los oligonucleótidos reportados por Riollot y col. (2001). Cada determinación se realizó por triplicado en un volumen final de 10 µl conteniendo: 10 ng de ADNc, 5 µl de mezcla de PCR 2X (Real Mix, Biodynamics) y 0,15 µM de cada oligonucleótido sentido/antisentido. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Rotor Gene Q (Qiagen) utilizando el siguiente programa de ciclado: una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a la temp. de hibridización correspondiente y 30 segundos a 72°C, y una extensión final de 3 minutos a 72°C. Los resultados se analizaron con el programa REST 2009 V2.0.13, el cual determina la diferencia en la expresión relativa (ER) de genes entre muestras tratadas y muestras control, teniendo en cuenta la eficiencia de reacción y la

normalización mediante un gen de referencia ( $\beta$ -Actina) (Pfaffl y col., 2002).

	Sentido	Secuencia (5'→3')	Temp. de Hibridización	Referencia
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Sentido	CTTTTACAACGAGCTGCGTG	55°C	Riollet y col., 2001
	Antisentido	CACGTTCCGTGAGGATCTTC		
<b>IL-4</b>	Sentido	TGCCCAAAGAACAACAACTG	59°C	Riollet y col., 2001
	Antisentido	TTAGCCTTTCCAAGAGGTC		
<b>IL-10</b>	Sentido	TGCACAGCTTACTGTTGACC	58°C	Riollet y col., 2001
	Antisentido	CGCAGGGTCTTCAGCTTCTC		
<b>IL-12 p40</b>	Sentido	AGGTCGTGGTAGAAGCTGTG	55°C	Riollet y col., 2001
	Antisentido	CCTTGTGGCATGTGACTTTG		
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Sentido	AATGCAAGTAGCCCAGATG	59°C	NM_174086
	Antisentido	GATCTGCAGATCATCCACCGG		
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Sentido	AACAGCCCTCTGGTTCAAAC	55°C	Riollet y col., 2001
	Antisentido	TCTTGATGGCAGACAGGATG		

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de citoquinas de muestras de ARNm extraído de células mononucleares bovinas.

## II.4. RESULTADOS

De los 27 animales incluidos inicialmente en el estudio, 1 del grupo Iscom Matrix™ y 1 del grupo Al(OH)<sub>3</sub> fueron descartados debido a la presencia de IIM por *S. aureus* al parto, 2 del grupo Iscom Matrix™ y 1 del grupo Al(OH)<sub>3</sub> parieron fuera de las fechas de rango estipuladas, y 1 del grupo control murió a causa de prolapso uterino post-parto. Las vaquillonas que se mantuvieron en el ensayo parieron, en promedio, 38 y 10 días después de la aplicación de la primera y segunda dosis de vacuna, respectivamente.

La inmunización no causó reacciones adversas en el sitio de inyección en los animales de ninguno de los grupos evaluados. Sólo se observó una mínima dureza (< 2,5 cm) en 1 animal del grupo *S. aureus* en Al(OH)<sub>3</sub>, 5 animales del grupo *S. aureus* en Iscom Matrix™, y 1 animal del grupo control, durante las 72-96 horas posteriores a las inoculaciones.

Los análisis bacteriológicos resultaron negativos para *S. aureus* en todos los animales incluidos en el ensayo, durante los 60 días de muestreo.

### II.4.1. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN SANGRE

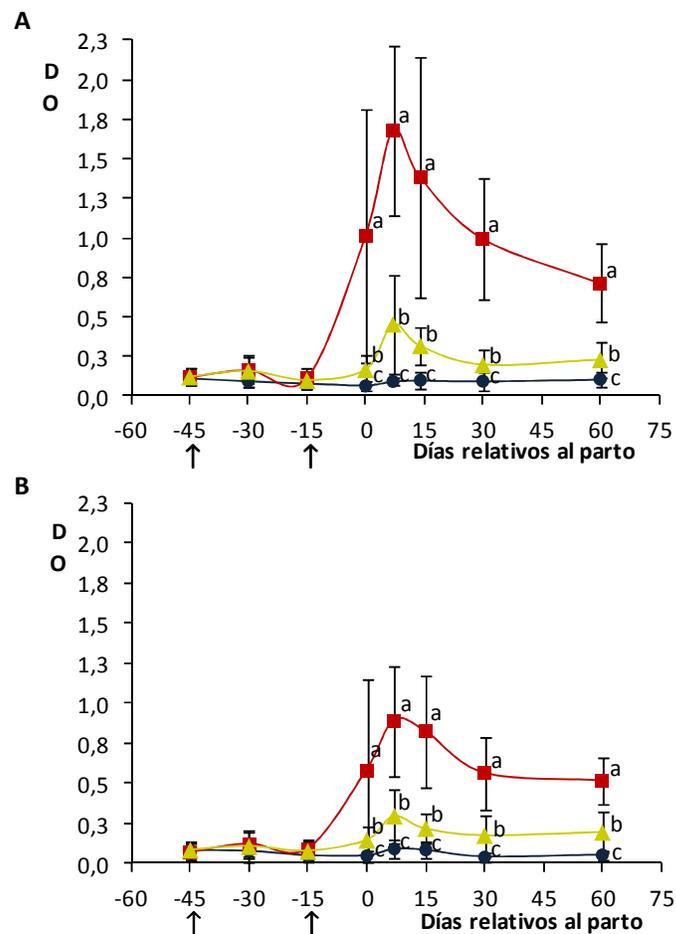
#### II.4.1.1. Respuesta de anticuerpos anti- *S. aureus*

Se realizó la determinación de los niveles de IgG e IgG<sub>2</sub> específica para *S. aureus* Reynolds, en todas las muestras de sangre de todos los animales en estudio. No se detectaron anticuerpos anti-*S. aureus* en ninguno de los animales, al comienzo del ensayo (Figura 5.A y B).

Luego de la inmunización, las vaquillonas inoculadas con *S. aureus* en Iscom Matrix™ presentaron los mayores niveles de IgG anti-bacterina en sangre (Figura 5.A). Estos niveles se incrementaron luego de la segunda dosis de vacuna y se mantuvieron significativamente elevados respecto de los del grupo Al(OH)<sub>3</sub> o del grupo control, durante todo el estudio ( $p < 0,05$ ). La mayor producción de anticuerpos se registró al día 7 post-parto, donde los niveles de IgG resultaron 18 veces mayores a los del grupo control y casi 4 veces mayores a los del grupo Al(OH)<sub>3</sub>. Los anticuerpos remanentes a los 60 días post-parto fueron de casi el 50% del nivel máximo obtenido a la semana posterior al parto, y 6 veces mayores a los presentes en los sueros pre-inmunes. Los animales inmunizados con *S. aureus* en Al(OH)<sub>3</sub>, mostraron niveles de IgG significativamente superiores a los del grupo control ( $p < 0,05$ ) desde el momento del parto hasta el final del período de observación.

Los niveles de IgG<sub>2</sub> específica hacia *S. aureus* en sangre (Figura 5.B) de los animales que

recibieron la formulación con Iscom Matrix™, se mantuvieron significativamente elevados respecto de aquellos en el grupo Al(OH)<sub>3</sub> o control ( $p < 0,05$ ), luego de la segunda dosis de vacuna y hasta el final de ensayo. Para esta subclase de inmunoglobulina, los mayores niveles también se detectaron en la semana subsiguiente al parto, alcanzando valores 3 y 10 veces superiores a los de los grupos Al(OH)<sub>3</sub> y control, respectivamente. Los niveles de IgG<sub>2</sub> en los animales vacunados con *S. aureus* en Al(OH)<sub>3</sub>, fueron significativamente mayores que los del grupo control ( $p < 0,05$ ) desde el día cero al día 60, relativos al parto.



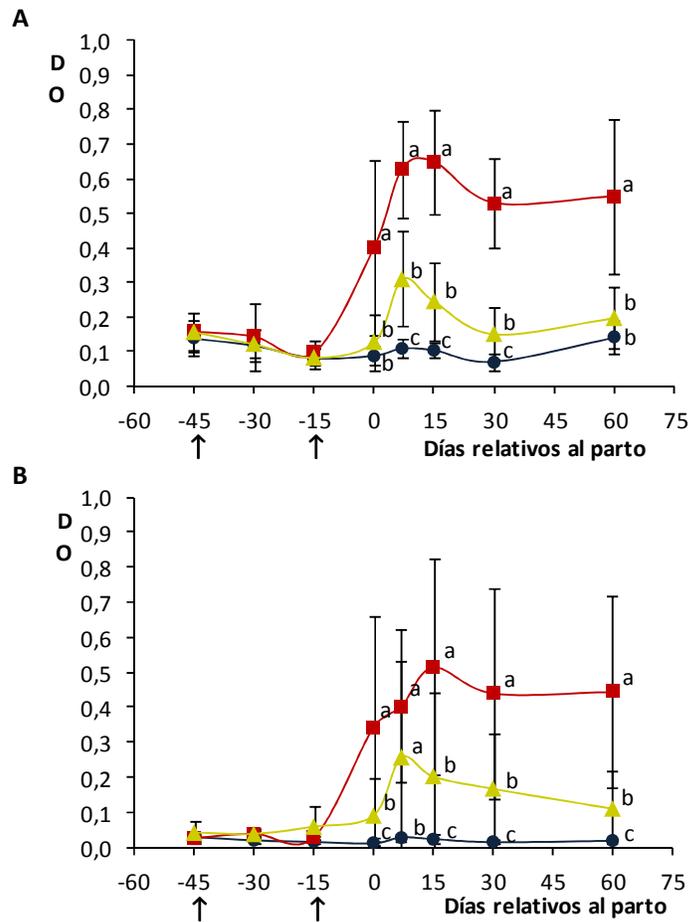
**Figura 5.** Niveles de IgG (A) e IgG<sub>2</sub> (B) anti-*S. aureus* en sangre de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* en inactivado Al(OH)<sub>3</sub> (▲) o control (●). Las flechas indican los momentos de las inmunizaciones. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### II.4.1.2. Respuesta de anticuerpos anti- CP5

Dada las características opsonofagocíticas de los anticuerpos dirigidos hacia los polisacáridos capsulares de *S. aureus*, se evaluó la capacidad de los inmunógenos de generar anticuerpos específicos para CP5.

Previamente a la vacunación, no se detectaron anticuerpos específicos anti-CP5 en ninguno de los animales incluidos en el estudio (Figura 6). Los niveles de IgG anti-CP5 en sangre (Figura 6.A) de los animales inmunizados con *S. aureus* en Iscom Matrix™ fueron los mayores entre los 3 grupos evaluados ( $p < 0,05$ ), desde el día del parto y hasta el fin del período de observación. La mayor producción de estos anticuerpos se observó entre la primera y segunda semana posteriores al parto, con valores que duplicaron a los obtenidos en el grupo  $\text{Al(OH)}_3$  y triplicaron a los de los controles. Por su parte, la inmunización con la formulación con  $\text{Al(OH)}_3$  indujo niveles de IgG anti-CP5 significativamente mayores a los del grupo control desde la primera hasta la cuarta semana post-parto ( $p < 0,05$ ).

Desde el momento del parto y hasta el final del estudio, las vaquillonas del grupo Iscom Matrix™ desarrollaron niveles de  $\text{IgG}_2$  anti-CP5 en sangre (Figura 6.B) significativamente mayores a los del resto de los grupos evaluados ( $p < 0,05$ ); excepto para el día 7 post-parto, donde no se encontraron diferencias significativas entre los títulos obtenidos para los grupos Iscom Matrix™ y  $\text{Al(OH)}_3$ . Los niveles de  $\text{IgG}_2$  anti-CP5 en el grupo que recibió la formulación con  $\text{Al(OH)}_3$  se mostraron significativamente elevados respecto a los detectados en el grupo control ( $p < 0,05$ ) desde el momento del parto y hasta los 60 días posteriores.



**Figura 6.** Niveles de IgG (A) e IgG<sub>2</sub> (B) anti-CP5 en sangre de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* inactivado en Al(OH)<sub>3</sub> (▲) o control (●). Las flechas indican los momentos de las inmunizaciones. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

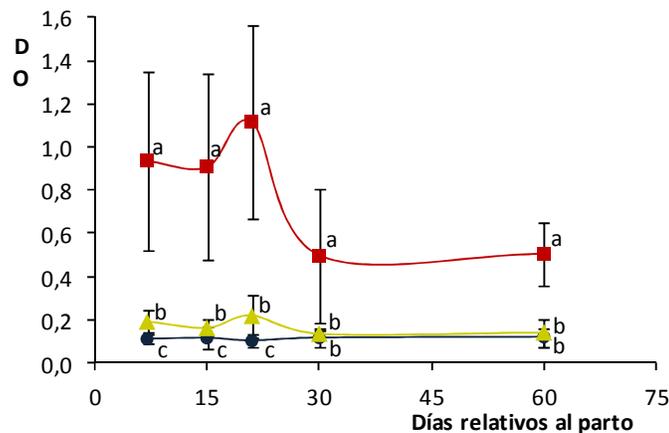
#### II.4.2. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN LECHE

Se evaluó la presencia de IgG e IgG<sub>2</sub> específica para *S. aureus* y polisacárido capsular 5 en leche de todos los animales en estudio. Debido a la naturaleza de las muestras pre-calostroales y calostroales, las determinaciones se realizaron con las muestras obtenidas a partir de la primera semana posterior al parto.

Los niveles de IgG específica para *S. aureus* en leche (Figura 7) resultaron significativamente superiores en los animales del grupo Iscom Matrix™ con respecto a aquellos en los grupos Al(OH)<sub>3</sub> o control ( $p < 0,05$ ), desde la primera semana post-parto y hasta el final del período de

observación. En ambos grupos inmunizados se observó un pico máximo de producción de IgG anti- *S. aureus* a los 21 días post-parto. En los animales que recibieron la formulación con Iscom Matrix™ estos valores resultaron 10 y 5 veces superiores a los detectados en los animales de los grupos Al(OH)<sub>3</sub> o control, respectivamente. Los animales del grupo Al(OH)<sub>3</sub> desarrollaron niveles de IgG anti- *S. aureus* significativamente superiores al de los animales control ( $p < 0,05$ ) durante las 3 primeras semanas subsiguientes al parto.

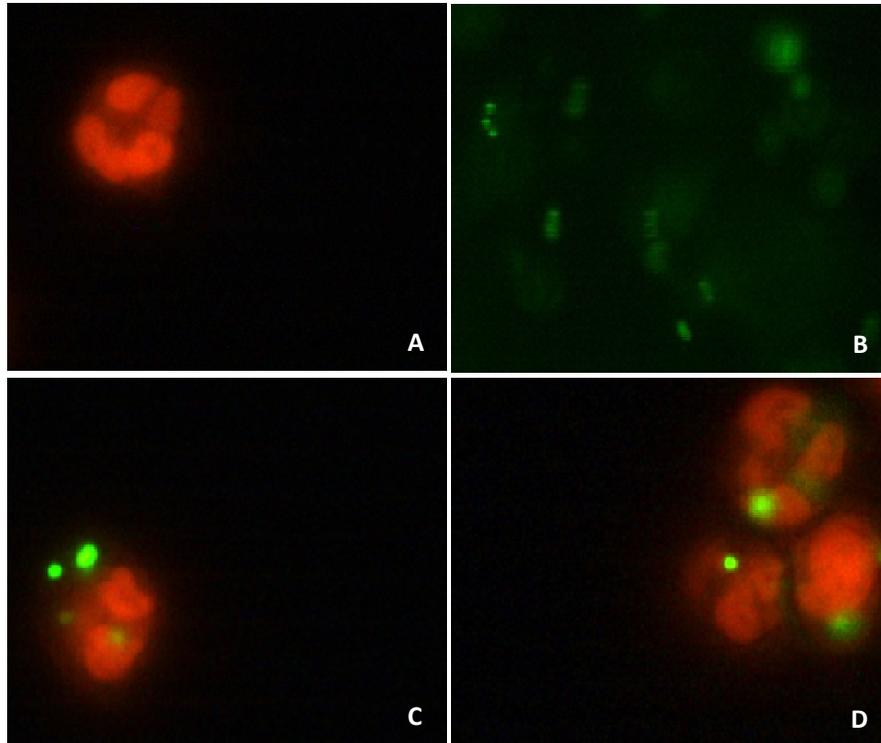
No se encontraron niveles detectables de IgG<sub>2</sub> anti- *S. aureus* ni IgG e IgG<sub>2</sub> anti-CP5 en esta secreción, en ninguno de los 3 grupos evaluados.



**Figura 7.** Niveles de IgG anti-*S. aureus* en suero de leche de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* inactivado en Al(OH)<sub>3</sub> (▲) o control (●). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

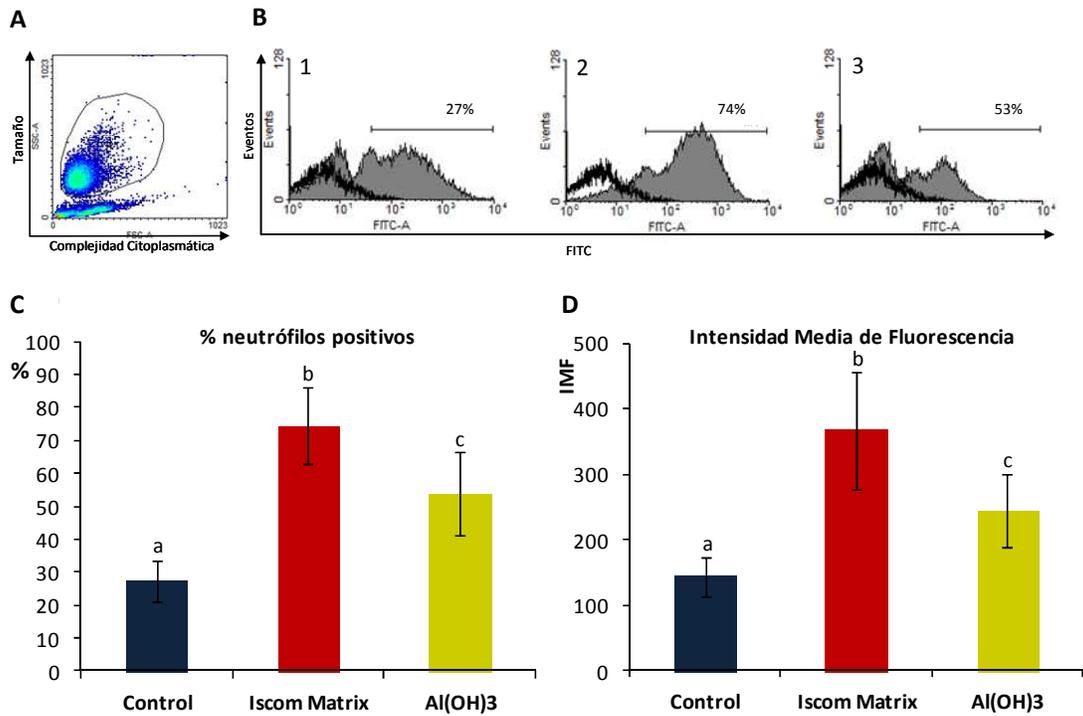
#### II.4.3. OPSONIZACIÓN Y FAGOCITOSIS POR NEUTRÓFILOS BOVINOS

Se evaluó *in vitro*, la capacidad de los anticuerpos generados por la vacunación de opsonizar *S. aureus* Reynolds, y mediar la fagocitosis por PMN bovinos. Se utilizaron los sueros obtenidos a los 7 días posteriores al parto de todos los animales incluidos en el estudio, dado que fue en dicho momento donde se detectó la mayor concentración de anticuerpos específicos. Los mismos se incubaron con una suspensión de *S. aureus* marcada con FITC y luego se agregaron los PMN. Finalizado el tiempo de reacción, la mezcla se sometió a tinción con BrEt (Figura 8).



**Figura 8.** Opsonofagocitosis de *S. aureus* in vitro por neutrófilos bovinos, observada en microscopio de fluorescencia (100X). **A)** PMN bovino marcado con BrET; **B)** *S. aureus* marcado con FITC; **C)** y **D)** *S. aureus*/FITC fagocitados por PMN bovinos.

Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Se seleccionó la población R1 conteniendo a los PMN, sobre la base de los parámetros de tamaño y complejidad celular (Figura 9.A). Dentro de dicha región se realizó el análisis de incorporación de bacterias mediante el recuento de células FITC positivas en histogramas de escala logarítmica. (Figura 9.B). Los sueros de los animales inoculados con *S. aureus* en Iscom Matrix™ aumentaron 1,4 y 2,7 veces el porcentaje de neutrófilos con bacterias fagocitadas ( $74,5\% \pm 11,5\%$ ), comparado con los sueros de los animales vacunados con *S. aureus* en  $Al(OH)_3$  ( $53,9\% \pm 12,5$ ), o los animales control ( $27,3\% \pm 6,3$ ), respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 9.C). El número de bacterias ingeridas por PMN positivo se estimó utilizando el parámetro IMF (Figura 9.D). Éste, también resultó significativamente mayor cuando los sueros de los animales del grupo Iscom Matrix™ se utilizaron en los experimentos de fagocitosis ( $367 \pm 90$ ), que al utilizar los sueros de los grupos  $Al(OH)_3$  ( $244 \pm 56$ ) o control ( $143 \pm 31$ ) ( $p < 0,05$ ).

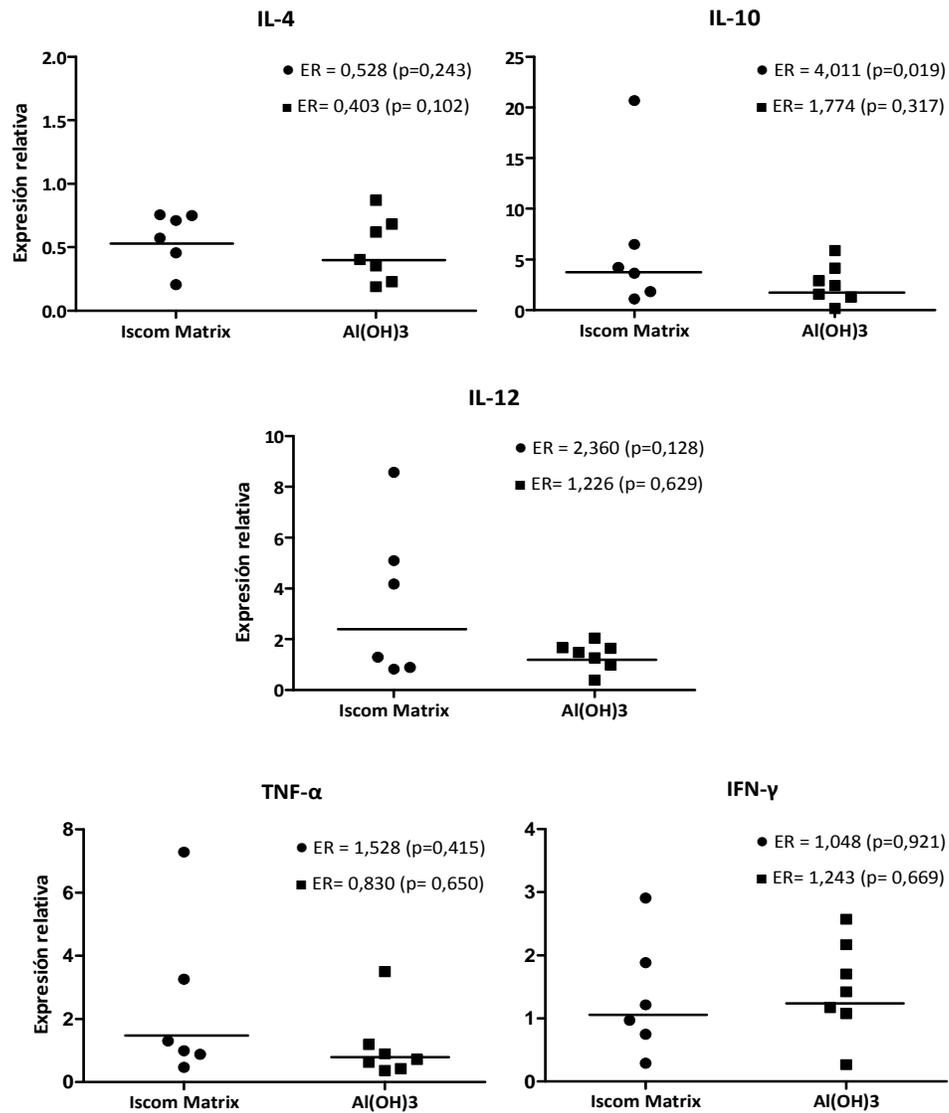


**Figura 9:** Fagocitosis por neutrófilos bovinos de *S. aureus* Reynolds opsonizado con sueros obtenidos a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix<sup>TM</sup>, *S. aureus* inactivado en Al(OH)<sub>3</sub> y control. **A)** población de PMN seleccionada sobre la base de tamaño vs complejidad citoplasmática. **B)** Histogramas representativos mostrando la intensidad de fluorescencia para PMN control incubados con medio de cultivo (vacío) o PMN incubados con sueros de animales inmunizados con *S. aureus* en Iscom Matrix<sup>TM</sup> (2), *S. aureus* en Al(OH)<sub>3</sub> (3) o control (1) (gris). La fagocitosis por PMN se expresó como porcentaje de células positivas (**C**) y como IMF (**D**). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### II.4.4. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Como una medida indirecta de activación celular se evaluaron los perfiles de citoquinas producidos por cada una de las formulaciones. Para ello, se obtuvo ARN de células mononucleares de sangre periférica de muestras tomadas a las 24 horas de aplicada la segunda dosis de vacuna. Se analizaron los niveles de ARNm de IL-4, IL-10, IL-12 p40, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . La expresión se normalizó con un gen de referencia ( $\beta$ -Actina) y se compararon los niveles de expresión en animales inmunizados, respecto de los niveles en animales control (Figura 10).

Se detectaron transcritos para todas las citoquinas en todos los animales ensayados. Los análisis cuantitativos mostraron niveles significativamente incrementados de IL-10 en el grupo Iscom Matrix™, relativos a los controles (ER 4,011;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, esta diferencia no se observó para el grupo Al(OH)<sub>3</sub>. Si bien no se hallaron diferencias significativas en la expresión de IL-12 para ninguno de los grupos inmunizados respecto de los controles, 3 de los 6 animales del grupo Iscom Matrix™ presentaron niveles elevados de la misma. La formulación con Iscom Matrix™ indujo un incremento de TNF- $\alpha$  en 2, e INF- $\gamma$  en 1 animal; mientras que la inmunización con *S. aureus* en Al(OH)<sub>3</sub> se asoció con altos niveles de estas citoquinas en 1 y 2 animales, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos vacunados respecto de los controles para ninguna de estas citoquinas. La expresión de IL-4 no se vio afectada por ninguno de los tratamientos.



**Figura 10.** Niveles de expresión las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN-γ y TNF-α relativa al grupo control, observados *in vivo* luego de 24 horas de aplicada la segunda dosis de vacuna, en animales inmunizados con *S. aureus* en Iscom Matrix™ o con *S. aureus* en Al(OH)<sub>3</sub>. Los valores medios de ER se muestran en el extremo superior derecho de cada gráfico y se representan como líneas horizontales.

## II.5. DISCUSIÓN

En esta primera parte del trabajo, se comparó la respuesta inmune desarrollada en vaquillonas preñadas a la inmunización con una bacterina de *S. aureus* CP5 formulada con  $\text{Al}(\text{OH})_3$  o con el adyuvante de nueva generación Iscom Matrix™. Existe escasa información sobre el uso de complejos inmuno-estimulantes en la formulación de vacunas contra mastitis bovinas producidas por *S. aureus*. En un estudio preliminar, Nelson y col. (1991), inmunizaron bovinos con una proteína de unión a fibronectina (FnBP) formulada con ISCOMs, confirmando protección contra mastitis luego de un desafío experimental, comparado con los animales en un grupo control. En estudios más recientes, el agregado de Iscom Matrix™ al antígeno FnBP (US/PCT/SE2006/000082) generó una respuesta humoral hacia el péptido FnBP tanto en sangre como en leche de vaquillonas primíparas, que se mantuvo durante todo el período de lactancia (Morein y col., 2007b). El presente estudio es el primer informe del uso de este adyuvante de nueva generación en la formulación de vacunas de células enteras de *S. aureus*.

Las vaquillonas recibieron 2 dosis de vacuna antes del parto, de modo de alcanzar niveles de anticuerpos elevados durante el primer mes post-parto, debido a la alta susceptibilidad a IIM en ese período (Sordillo y Streicher, 2002; Burton y Erskine, 2003). La cinética de anticuerpos resultó similar entre ambos grupos vacunados, mostrando un pico de máxima producción durante la primera y segunda semana post-parto para los anticuerpos dirigidos hacia la bacterina y CP5, respectivamente. Entre los inmunógenos evaluados, la formulación con Iscom Matrix™ indujo respuestas de IgG e IgG<sub>2</sub> anti-bacterina y anti-CP5 significativamente mayores que aquellas obtenidas para la formulación con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , manteniéndose estas diferencias hasta el final del período de observación (día 60 post-parto). Sjölander y col. (1997) describieron un modelo de inmunización con ovalbúmina (OVA), formulada con ISCOMs y con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , en el cual los títulos de las subclases IgG<sub>2a</sub> y IgG<sub>2b</sub> fueron varias veces superiores para los ratones inmunizados con OVA+ISCOMs, comparado con aquellos inmunizados con OVA+ $\text{Al}(\text{OH})_3$ . No obstante, las diferencias entre las especies animales y los inmunógenos utilizados dificultan las comparaciones. En un estudio realizado en vaquillonas preñadas, la inmunización con una vacuna trivalente de células enteras formuladas con  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , incrementó las respuestas de IgG<sub>2</sub> contra los antígenos CP5 y CP8 purificados, pero este efecto se mantuvo solamente por 14 días luego del parto (Lee y col., 2005). En el presente estudio, en cambio, si bien se observó una disminución en los niveles de IgG<sub>2</sub> anti-CP5 para los animales del grupo  $\text{Al}(\text{OH})_3$  luego de 15 días de ocurrido el parto, los valores siguieron manteniéndose significativamente elevados respecto de los controles. Sin embargo esta disminución no se

observó en los animales vacunados con la formulación con Iscom Matrix™.

Se determinó la presencia de IgG<sub>2</sub>, en sangre y leche, dado que esta subclase es considerada la opsonina más importante involucrada en la fagocitosis por neutrófilos en la glándula mamaria infectada (Sordillo y Streicher, 2002; Paape y col., 2003). A pesar de que la IgG<sub>1</sub> es la subclase predominante en leche normal debido a la transferencia selectiva de la sangre a leche, su concentración disminuye durante la inflamación y el rol exacto de la misma en la defensa inmune frente a IIM no se encuentra aún definido (Burton y Erskine, 2003). La IgG<sub>2</sub> aumenta considerablemente durante la inflamación, actuando como opsonina para incrementar la actividad fagocítica de los PMN bovinos; teniendo un rol trascendental en la eliminación de patógenos de la glándula mamaria (Paape y col., 2003; Sordillo y Streicher, 2002). Los niveles significativamente elevados de IgG<sub>2</sub> en los animales del grupo Iscom Matrix™, en comparación con aquellos que recibieron la formulación con Al(OH)<sub>3</sub>, concuerdan con observaciones previas sobre la capacidad de los ISCOMs de producir diferentes subclases de IgG antígeno-específicas (Sjölander y col., 1997; Morein y Bengtsson, 1999; Morein y col., 2007a). A pesar de que la presentación antigénica de antígenos particulados por ISCOMs ha sido ampliamente estudiada (Sun y col., 2009), los mecanismos involucrados en la presentación y el efecto adyuvante de una vacuna de células enteras formulada con estos complejos inmuno-estimulantes aún no han sido abordados.

Con respecto a la detección de anticuerpos en leche, aquellas vaquillonas que recibieron la bacterina adyuvada con Iscom Matrix™ mostraron niveles de IgG anti-*S. aureus* significativamente mayores a aquellos que recibieron la formulación con Al(OH)<sub>3</sub>. Sin embargo, no se detectó IgG<sub>2</sub> anti-*S. aureus* ni anti-CP5 en esta secreción. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos donde la inmunización intra-mamaria con *S. aureus* CP5 y CP8 inactivado por calor (Barrio y col., 2003), o la administración subcutánea de una bacterina comercial conteniendo *S. aureus* CP5, CP8 y tipo 336 (Luby y col., 2007; Middleton y col., 2009) o de una mutante avirulenta de *S. aureus* (Pellegrino y col., 2010), no produjeron niveles detectables de IgG<sub>2</sub> en leche. A pesar de que la ausencia de IgG<sub>2</sub> podría sugerir que no se encuentre presente en leche en concentraciones suficientes durante la interacción temprana entre *S. aureus* y las defensas del huésped, esta subclase aumenta sustancialmente durante la inflamación debido a una entrada masiva a leche y la unión a receptores Fcγ2 de los neutrófilos reclutados (Zhang y col., 1995; Sordillo y Streicher, 2002). Por lo tanto, el sinergismo entre los altos niveles de IgG<sub>2</sub> específica en sangre de los animales del grupo Iscom Matrix™ y los neutrófilos migrantes resultarían en la estimulación de una respuesta efectora específica, que aumentaría la capacidad de fagocitosis y la eliminación de bacterias en la glándula mamaria infectada

(Burton y Erskine, 2003; Paape y col., 2003). Sin embargo, este efecto protector debe aún ser comprobado.

La capacidad opsonica de los anticuerpos generados por la vacunación se evaluó *in vitro* mediante ensayos de opsonofagocitosis con PMN bovinos. Se utilizaron las muestras de suero tomadas en la primera semana post-parto dado que, en promedio, fueron las que presentaron mayores títulos de anticuerpos. Se observó un porcentaje significativamente mayor de PMN positivos para *S. aureus* con los sueros de los animales inmunizados con la formulación con Iscom Matrix™. Además, se evaluó la IMF generada por cada grupo como una medida indirecta de la cantidad de bacterias fagocitadas por célula positiva (Zetterlund y col., 1998). Este factor, también resultó significativamente mayor para el grupo Iscom Matrix™, indicando que, no solo un mayor número de PMN fue capaz de fagocitar bacterias, sino que además, tuvieron una capacidad de ingestión acrecentada. Esta actividad aumentada puede atribuirse a la presencia de anticuerpos específicos hacia el CP5 dado que, en estudios previos, se mostró que sólo los anticuerpos generados hacia los CPs fueron capaces de incrementar la actividad fagocítica de los PMN bovinos (Guidry y col., 1991; Guidry y col., 1994).

La estimulación del sistema inmune innato posee un importante rol en la evolución hacia la respuesta inmune adaptativa (Hoebe y col., 2004). Por esto, la inclusión de inmunopotenciadores capaces de desencadenar respuestas inmunes innatas tempranas que colaboren en la generación de respuestas inmunes adaptativas robustas y duraderas, son de crucial importancia en la eficiencia de las vacunas. En este estudio se evaluó la activación innata y de células T mediante la determinación de la expresión relativa de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12 p40, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Zhu y col., 2010) en células mononucleares de sangre periférica 24 horas después de la administración de la segunda dosis de vacuna, como una medida indirecta de la activación de las subpoblaciones de células T. Los resultados concuerdan con experiencias previas obtenidas con formulaciones con ISCOMs (Morein y col., 2004 y 2007b). Las vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* en Iscom Matrix™ mostraron, en promedio, mayores niveles de IL-10 e IL-12 relativos al control, que aquellas que recibieron la formulación con Al(OH)<sub>3</sub>. La IL-12 juega un rol central en el mecanismo de acción de los ISCOMs. Estos inmuno-complejos pueden estimular células dendríticas ya sea por su naturaleza particulada o por la presencia de moléculas como QuilA, aumentando la expresión de IL-12 e interferones de Tipo I (Robson y col., 2003). Además, se demostró que la inmunogenicidad de los ISCOMs depende de una cascada de respuestas inmunes innatas mediada por IL-12 (Smith y col., 1999). Con respecto a IL-10, un incremento en esta citoquina se describió previamente en un modelo de inmunización murina contra *Leishmania* utilizando ISCOMs (Papadopoulou y col.,

1998). En un estudio realizado en vacas en lactancia previamente inmunizadas con 2 dosis de  $\alpha$ -toxina en adyuvante incompleto de Freund, el desafío intramamario con la toxina no indujo niveles detectables de IL-10 en ninguno de los tiempos evaluados (Riollet y col., 2001). Sin embargo, se debe tener en cuenta que no existe información previa sobre la cinética de expresión de citoquinas luego de la inmunización para mastitis por *S. aureus* en bovinos (Pereira y col., 2011), y que la expresión de las mismas fue evaluada, en este estudio, en un único momento. A pesar de estas limitaciones, se observó una tendencia hacia una mayor estimulación de una citoquina pro-inflamatoria, como la IL-12, como de una reguladora, IL-10, en el grupo vacunado con Iscom Matrix™.

En conclusión, la inmunización con un inmunógeno experimental compuesto por células enteras de *S. aureus* y formulado con Iscom Matrix™ potenció la respuesta inmune humoral a través de la producción de IgG específica en sangre y leche y un significativo incremento de los títulos de IgG<sub>2</sub> sanguíneos, lo cual aumentó la capacidad opsónica comparada con una vacuna formulada con un adyuvante tradicional. Sobre la base de estas características se seleccionó a Iscom Matrix™ como adyuvante para la formulación de los próximos inmunógenos a evaluar en este trabajo de tesis.

## CAPÍTULO III: OBTENCIÓN DE ANTIGENOS RECOMBINANTES DE *Staphylococcus aureus*

### III.1. MARCO TEÓRICO

*Staphylococcus aureus* se caracteriza por la presencia de múltiples factores de virulencia, algunos de los cuales estarían relacionados con la severidad de la IIM que desarrollan en el huésped (Fournier y col., 2008). Investigaciones realizadas durante las últimas dos décadas, destinadas a la obtención de inmunógenos para el control de las mastitis estafilocócicas, centraron su atención en aquellos factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, estimulando a su vez las defensas inmunes de la glándula mamaria bovina (Foster, 1991; Sutra y Poutrel, 1994; Kerro Dego y col., 2002; Zeconi y col., 2006).

La  $\beta$ -toxina de *S. aureus*, es una exoproteína hemolítica que daña la membrana, presente en la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovina (Aarestrup y col., 1999; Larsen y col., 2002; Ote y col., 2011). Posee función de esfingomielinasa y es capaz de actuar sobre neutrófilos (Marshall y col., 2000) y linfocitos de sangre periférica, específicamente, células T proliferativas, actuando así en la evasión de los mecanismos inmunes (Huseby y col., 2007). Para determinar el poder patógeno de la toxina se realizaron estudios en ratones y cultivos celulares *in vitro*, con cepas mutantes de *S. aureus* deficientes en  $\beta$ -toxina. La expresión de  $\beta$ -toxina pudo asociarse con mayores recuentos bacterianos, mayor severidad de la sintomatología clínica y mayor capacidad de adherencia a células epiteliales mamarias (Bramley y col., 1989; Calvino y col., 1993; Cifrian y col., 1996a). Este último efecto sería producto de la hidrólisis de la esfingomielina de la membrana plasmática, conduciendo a un incremento de la permeabilidad celular (Low y Feer, 1977). Además, la expresión de  $\beta$ -toxina estaría relacionada tanto con el escape de *S. aureus* al citoplasma mediante la ruptura de la membrana del endosoma, como en la apoptosis celular y daño tisular (Shompole y col., 2003).

*Staphylococcus aureus* posee la habilidad de internalizarse en células epiteliales y fagocíticas no profesionales (Almeida y col., 1996; Gresham y col., 2000; Sinha y Fraunholz, 2010), lo cual lo protegería de la respuesta inmune humoral del huésped y del tratamiento con antibióticos (Hebert y col., 2000). Dicha capacidad estaría relacionada con la expresión de proteínas de superficie de unión a Fibronectina, FnBP-A y FnBP-B (Fowler y col., 2000), las cuales se encuentran presentes en la mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones humanas y bovinas, (Rice y col., 2001; Mongodin y col., 2002; Ote y col., 2011; Klein y col.,

2012). Cada FnBP posee 3 dominios D de unión a Fn, que si bien pueden unirse individualmente a la Fn, su disposición en tándem conforma un dominio de unión, D1-3, de mayor afinidad (Signas y col., 1989; Jonsson y col., 1991). Diversos trabajos realizados con cepas mutantes permitieron demostrar una asociación entre la expresión de FnBP y la invasión celular (Fowler y col., 2000; Dziewanowska y col., 1999; Brouillette y col., 2003), mediante un mecanismo por el cual la Fn plasmática actuaría como puente entre la FnBP del microorganismo y la integrina-  $\beta 1$  de las membranas celulares del huésped, conduciendo a la ingestión bacteriana (Fowler y col., 2000).

Las proteínas de unión a fibrinógeno, denominadas factores de agregación (Clumping factor, Clf), son otros de los antígenos de *S. aureus* que han sido propuestos como candidatos para la formulación de inmunógenos destinados al control de IIM. Se han descrito dos factores de agregación, ClfA y ClfB, los cuales se encuentran presentes en la mayoría de las cepas de *S. aureus* humanas y bovinas (Gonano y col. 2009; Klein y col., 2012). Ambas moléculas se componen de una secuencia señal, seguida de una región A que contiene el dominio de unión a fibrinógeno, una región repetitiva R y finalmente un dominio de anclaje a membrana (Hartford y col., 1997; Ní Eidhin y col., 1998). Su interacción con el fibrinógeno plasmático resulta en una aglomeración instantánea de las células bacterianas. Cada una de estas proteínas reconocen diferentes partes de la molécula de fibrinógeno, y actuarían de forma sinérgica para permitir a la bacteria adherirse más firmemente en la circulación sanguínea (Ní Eidhin y col., 1998). Sin embargo, sería ClfA el que cumpliría el principal rol de adhesina en células en fase temprana de crecimiento (Ní Eidhin y col., 1998). ClfA posee además propiedades anti-fagocíticas, las cuales no son necesariamente dependientes de fibrinógeno (Higgins y col., 2006), ya que esta molécula, sería también capaz de inhibir la activación de la vía alternativa del complemento mediante la escisión de C3b en su forma inactiva (Hair y col., 2010).

### III. 2. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Obtener moléculas recombinantes de los antígenos  $\beta$ -toxina, ClfA y FnBP-A de *S. aureus*.

- **Objetivos específicos**

1. Obtener la secuencia codificante para la  $\beta$ -toxina de *S. aureus*.
2. Clonar el fragmento en el vector de expresión pET32a y expresar en células de *E.coli*.
3. Purificar la  $\beta$ -toxina recombinante, así como las proteínas recombinantes FnBP-A y ClfA, a partir de clones disponibles previamente en el laboratorio.
4. Obtener la  $\beta$ -toxina nativa de *S. aureus*.
5. Evaluar la actividad hemolítica de las toxinas obtenidas.

### III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.3.1. OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES $\beta$ -TOXINA, FNBP-A Y CLFA DE *S. aureus*

##### III.3.1.1. Obtención del fragmento codificante para la $\beta$ -toxina de *S. aureus*

###### III.3.1.1.1. Selección de una cepa de *S. aureus* productora de $\beta$ -toxina

Se evaluó la producción de las toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  en 10 cepas de *S. aureus* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología del Área de Investigación en Producción Animal (A.I.P.A.) de la EEA Rafaela. Se preparon placas con Agar Base suplementado con 5 % de glóbulos rojos (GR) de carnero, previamente lavados 3 veces con solución salina estéril. Se sembraron a lo largo de la placa 1 estría de la cepa *Corynebacterium pseudotuberculosis* NCTC 3450 y 1 de la cepa *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956 y se incubó por 24 horas a 37°C en atmósfera con 10% CO<sub>2</sub>. Luego de la incubación se sembraron las cepas de *S. aureus* a evaluar, así como la cepa de referencia Reynolds, en ángulo recto a las estrías previamente crecidas y se incubó nuevamente por 24 horas a 37°C en atmósfera con 10% CO<sub>2</sub>. *C. pseudotuberculosis* es capaz de producir sustancias que inhiben el efecto lítico de la  $\alpha$  y  $\beta$  toxinas de *S. aureus* pero no afectan la  $\delta$  hemólisis. *Streptococcus agalactiae* produce sustancias que lisan los glóbulos rojos de carnero en presencia de  $\beta$ -toxina de *S. aureus* (Calvinho y Dodd, 1994).

###### III.3.1.1.2. Obtención de ADN genómico de *S. aureus*

La cepa productora de  $\beta$ -toxina seleccionada se cultivó en 10 ml de caldo Tripteína Soya durante toda la noche a 37°C en agitación. Las bacterias se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 rpm y se descartó el sobrenadante. A partir del pellet obtenido se procedió a la purificación del ADN genómico utilizando el kit comercial Genomics DNA Extraction Kit (Real Biotech Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN en las muestras se cuantificó midiendo la Abs. a 260 nm en espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), y se evaluó la pureza de las mismas mediante la determinación de la relación de Abs. 260/280.

###### III.3.1.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para obtener la secuencia codificante correspondiente a la proteína de interés, se realizaron reacciones de amplificación por PCR. El diseño de los oligonucleótidos cebadores se

realizó sobre la base de secuencias reportadas en GenBank (N° Acceso X13404; Projan y col., 1989). Como apoyo se utilizó el programa para diseño de oligonucleótidos PrimerBlast. Éstos fueron sintetizados comercialmente (Productos Bio-lógicos).

Se introdujeron en los extremos 5' de los oligonucleótidos las secuencias correspondientes a sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, para facilitar el posterior clonado de los mismos (Tabla 3).

	Sentido	Secuencia (5'→ 3')	Enzima de restricción
<b>β-toxina</b>	Sentido	<i>ggatccAAAGGAGTGATAATGATG</i>	BamHI
	Antisentido	<i>gaattcCTATTTACTATAGGCTT</i>	EcoRI

**Tabla 3.** Oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación del fragmento codificante para la β-toxina de *S. aureus*.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), por duplicado, en un volumen final de 50 µl conteniendo la siguiente mezcla de reactivos (Productos Bio-Lógicos): 5 µl de buffer termofílico 10X, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido, 1,25 U de Taq ADN polimerasa y 50 ng de ADN genómico, siguiendo el programa de ciclado detallado en la Tabla 4. En todas las reacciones se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de igual manera a lo descrito anteriormente, pero reemplazando el volumen de ADN molde por agua bidestilada estéril.

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)
1	95	3 min
	95	30
10	50	30
	72	60
25	95	30
	58	30
1	72	60
	72	5 min

**Tabla 4.** Programa de ciclado utilizado en la amplificación del gen de β-toxina mediante reacción de PCR.

#### **III.3.1.1.4. Análisis de los productos de amplificación**

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos se sembraron las muestras en la proporción correspondiente de buffer de muestra 6X en geles al 1% de agarosa. Los geles fueron preparados en buffer TAE 1X, adicionándose GelRed™ 10.000X (Biotium, Inc) a una concentración final 1X. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales (BioRad) en el mismo buffer a 85 V. Como marcadores de tamaño se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (100 bp ladder, Productos Bio-Lógicos). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV ( $\lambda$  255 nm) (DNR, Bio - Imaging Systems).

#### **III.3.1.1.5. Purificación de los fragmentos amplificados**

Para aislar los fragmentos de interés, se corrió el ADN obtenido en la reacción de PCR en un gel de agarosa, según se describió anteriormente. Una vez identificada la banda a purificar, se cortó la porción de gel que la contenía y se purificó el fragmento utilizando el kit comercial HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit (Real Biotech Corporation), según instrucciones del fabricante.

#### **III.3.1.1.6. Análisis de la secuencia de los fragmentos codificantes**

Para determinar la secuencia de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, luego de su purificación, se realizó una ligación de los mismos al vector pGEM-T Easy (Promega) (Ver III.3.1.2.5.) según indicaciones del fabricante. Con el producto de ligación se transformaron células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  (III.3.1.2.6.). A las colonias identificadas como positivas, se les realizó una minipreparación de ADN plasmídico (III.3.1.2.3.), y se procedió a la secuenciación del ADN en el C.I.C.V.yA. INTA-Castelar (Bs. As), en un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems) con la química BigDye (Amersham), utilizando los oligonucleótidos T7 promotor y SP6.

### **III.3.1.2. Obtención de los clones recombinantes de $\beta$ -toxina**

#### **III.3.1.2.1. Cepas**

Las características de las cepas de *Escherichia coli* empleadas para el clonado y expresión de proteínas recombinantes se describen en la siguiente tabla:

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagen®
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen®

**Tabla 5.** Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en las técnicas de clonado molecular y expresión de la proteína recombinante.

### III.3.1.2.2. Vectores plasmídicos

Las características de vectores plasmídicos utilizados para el clonado de las secuencias codificantes se describen en la Tabla 6:

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T <i>Easy</i>	3018 pb, resistencia a Ampicilina, promotor T7, linealizado, extremos 3' con agregado de T. Este vector fue utilizado para el subclonado de productos de PCR en la cepa DH5α de <i>E. coli</i> .	Promega, EE.UU.
pET-32a	5900 pb, resistencia a Ampicilina, promotor T7lac, produce proteínas fusionadas a 6 Histidinas y a la proteína tiorredoxina (TRX), de 20,4 kDa, lo que permite su purificación en columna de NTA-Ni <sup>2+</sup> . Este vector fue utilizado como sistema de expresión en la cepa BL21(DE3) de <i>E. coli</i> .	Novagene, EE.UU.

**Tabla 6.** Vectores plasmídicos utilizados para el clonado de los fragmentos codificantes.

### III.3.1.2.3. Minipreparación de ADN plasmídico

Se cultivaron *E. coli* BL21(DE3) portando el plásmido pET32a y *E. coli* DH5α portando la construcción pGEM-T *Easy* / fragmento codificante, en 10 ml de medio LB suplementado con 0,1mg/ml de ampicilina, a 37°C durante toda la noche en agitación a 180 rpm. El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El ADN plasmídico se purificó a partir del pellet celular con el kit comercial HiYield™ Plasmid Mini Kit (Real Biotech Corporation) según instrucciones del fabricante.

### III.3.1.2.4. Digestión del ADN

Las minipreparaciones de pET32a y pGEM-T *Easy* / fragmento codificante, se sometieron a

digestiones enzimáticas con las endonucleasas de restricción BamHI y EcoRI, según instrucciones del fabricante (Promega, EE.UU.). Se prepararon mezclas de ADN (0,1-1 ug), ASB 0,1mg/ml y 3 U de enzima, en un volumen final de 20 µl, las cuales se incubaron durante 90 minutos a 37°C.

Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1%, y se aislaron las bandas conteniendo al fragmento codificante y al vector pET32a digeridos. Los mismos se purificaron utilizando un kit comercial HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit (Real Biotech Corporation), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **III.3.1.2.5. Ligación de los ADN digeridos**

Para realizar la reacción de ligación se mezcló el fragmento de ADN codificante con el vector pET32a, ambos previamente digeridos, en una relación molar 3:1. A la mezcla se le adicionaron 1 µl de buffer 10X de T4 DNA Ligasa (Fermentas) para un volumen final de 10 µl y 2 U de la enzima T4 DNA Ligasa (Fermentas). La mezcla de ligación se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se conservó a -20°C hasta su utilización.

#### **III.3.1.2.6. Clonado molecular**

Células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3) se cultivaron en medio líquido LB a 37°C y en agitación a 180 rpm hasta saturación. El cultivo saturado fue diluido 100 veces en el mismo medio y cultivado en las mismas condiciones hasta  $DO_{550} = 0,5 - 0,6$ . Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 500 µl de solución de transformación (ST) 1. Se centrifugó nuevamente y el pellet obtenido se resuspendió en 500 µl de ST2. La suspensión obtenida se incubó durante 20 minutos en hielo y se centrifugó. Finalmente el pellet se resuspendió en 100 µl de ST2.

La transformación propiamente dicha de las células se realizó mediante el agregado de 10 µl de la mezcla de ligación a las mismas. Esta suspensión se incubó primero en hielo por 1 hora y luego a 42°C por 45 segundos. Se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó a 37°C con agitación durante 60 minutos. Finalmente, las células se centrifugaron a 4.200 rpm por 5 minutos, se resuspendieron en 50 µl de medio LB y se distribuyeron sobre placas de Petri con LB-agar suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las bacterias que contenían el plásmido de interés se seleccionaron por la diferencia de peso molecular (PM) de la proteína expresada comparada en un SDS-PAGE (Ver III.3.1.3.3.). A las mismas se les realizó una minipreparación de ADN plasmídico (III.3.1.2.3.), y

se procedió a la secuenciación del ADN en el C.I.C.V.yA. INTA-Castelar (Bs. As), en un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems) con la química BigDye (Amersham), utilizando los oligonucleótidos T7 promotor y T7 reverse.

Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el paquete informático Staden (Bonfield y col., 1995), utilizando los programas PreGap4 para el control de calidad y filtrado de secuencias de vector, y Gap4 para el ensamblado de las secuencias directas y reversas. La secuencia consenso obtenida se alineó con la secuencia reportada en GenBank (N° Acceso X13404) utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999).

En los casos en que las transformaciones se realizaron con el vector pGEM-TEasy (III.3.1.1.6.), el cual permite una discriminación de las bacterias transformadas con plásmidos conteniendo insertos mediante el sistema de  $\alpha$ -complementación para la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se agregó Xgal (Promega) 0,006 (%p/v) e IPTG (Promega) 0,3 mM para reconocer las colonias recombinantes.

### **III.3.1.3. Obtención de las proteínas recombinantes**

Se trabajó con los clones recombinantes de  $\beta$ -toxina obtenidos según se describió previamente, y con clones disponibles en el laboratorio de las proteínas FnBP-A y ClfA. Los mismos fueron obtenidos mediante clonado de las secuencias codificantes correspondientes en el vector de expresión pET32a y su posterior transformación en células de *E. coli* BL21(DE3) (Pujato y col., 2011).

#### **III.3.1.3.1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes**

Células de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo las distintas construcciones plasmídicas se cultivaron durante toda la noche en agitación a 37°C en 5 ml de medio líquido LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Una alícuota de este cultivo fue diluido 100 veces en el mismo medio e incubado en iguales condiciones hasta alcanzar una  $DO_{550} = 0,5 - 0,6$ . Para la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes se agregó 7,5 mM de lactosa, para el caso de la  $\beta$ -toxina, y 0,5 mM de IPTG para ClfA y FnBP-A; y se continuó incubando a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego, se recogieron las células centrifugando a 4.500 rpm durante 15 minutos, se resuspendieron en solución de siembra y se agregó PMSF (Sigma) a concentración final 1mM. La suspensión se sonicó mediante pulsos de 50% durante 2 minutos a 600W, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recolectó el

sobrenadante.

#### **III.3.1.3.2. Purificación de las proteínas:**

El sistema utilizado consiste en una columna de IDA-Sepharosa (Amersham) sobre la cual se inmoviliza  $Ni^{2+}$ . Se utilizó una columna de 1 ml la cual se lavó con 10 volúmenes de solución de lavado y luego se sembró con el sobrenadante obtenido con la proteína recombinante, recirculándolo 2 veces. Se lavó con 10 volúmenes de solución de lavado. Para el caso de la  $\beta$ -toxina, posteriormente, se lavó con 4 volúmenes de cada una de las soluciones SR1, 2, 3 y 4, y luego nuevamente con solución de lavado. La elución de las proteínas de interés se realizó con 5 volúmenes de cada una de las soluciones SE1, 2, 3 y 4. La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE al 15%, seguida de tinción con azul de Coomassie (III.3.1.3.3.).

#### **III.3.1.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para la separación y el análisis de proteínas totales y purificadas, se empleó la técnica de separación electroforética de proteínas descrita por Laemmli (1970). Las proteínas se separaron electroforéticamente en mini-geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel de apilamiento se realizó a una concentración del 4,8% de Acrilamida/Bisacrilamida en tanto que el gel de separación se preparó a concentración de 15%.

Las muestras se diluyeron en buffer de muestra 4X, se sometieron a ebullición durante 5 minutos y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 segundos. Se sembraron 10  $\mu$ l de la mezcla en cada pocillo del gel. La electroforesis se realizó en el sistema MiniPROTEAN II (BioRad®) con buffer de corrida, a un voltaje constante de 150 V. Se utilizaron los marcadores de PM de proteínas Page Ruler Prestained (Fermentas) o SDS-Page Standards Low Range (Bio-Rad).

La fijación y tinción de geles se efectuó por inmersión en solución colorante y posteriormente se decoloró mediante incubación de 1 hora en solución decolorante I, seguida de 2 horas de incubación en solución decolorante II.

#### **III.3.1.3.4. Cuantificación de las proteínas**

La concentración de proteína en las muestras se cuantificó midiendo la Abs. a 280 nm en espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

### **III.3.2 OBTENCIÓN DE LA $\beta$ -TOXINA NATIVA DE *S. aureus*.**

Se trabajó con una cepa de *S. aureus* productora de  $\beta$ -toxina (Ver III.3.1.1.1.). La misma se cultivó en caldo Tripteína Soya a 37°C durante toda la noche. Cinco ml de dicho cultivo se utilizaron para inocular 100 ml de caldo Tripteína Soya fresco, incubando durante 7 horas a 37°C en agitación. Transcurrido dicho tiempo se centrifugó a 16.000 g durante 40 minutos a 10°C. Se descartó el pellet y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0,22  $\mu$ m para eliminar restos de bacterias enteras. Se agregó sulfato de amonio hasta 80% de saturación (56g/100ml), con agitación hasta disolución completa y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó nuevamente a 16.000 g durante 40 minutos a 10°C y el pellet obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de sulfato de amonio a 80% de saturación. Se centrifugó a 27.000 g durante 15 minutos a 10°C y se resuspendió el pellet en mínimo volumen de PBS. Finalmente se dializó contra 50 volúmenes de PBS durante 24 horas (Low y Freer, 1977). El producto se conservó a -20°C hasta su utilización.

El extracto proteico obtenido se evaluó por SDS-PAGE al 15%, seguido de tinción con azul de Coomasie (III.3.1.3.3.).

### **III.3.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LAS TOXINAS PURIFICADAS**

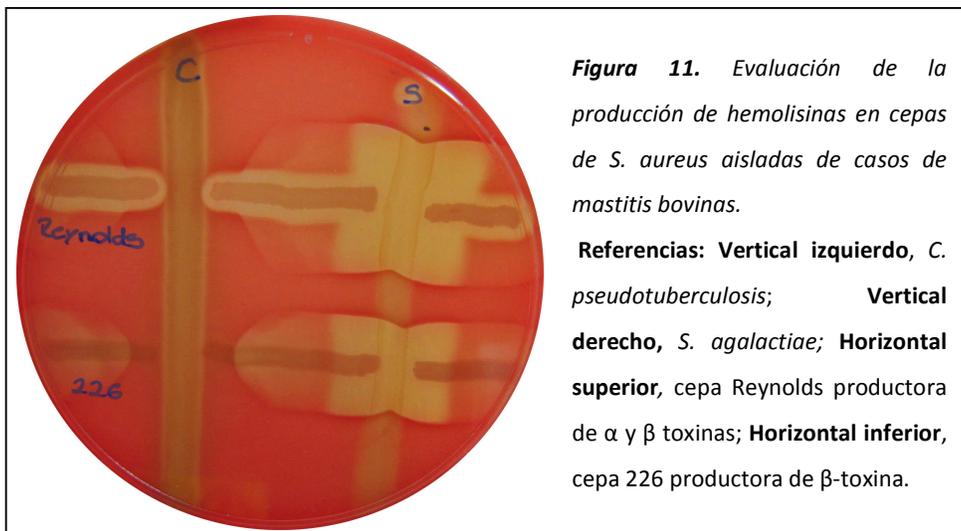
Se obtuvieron 20 ml de sangre de carnero por punción de la vena yugular. Tres ml de sangre se llevaron a 10ml con PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 2.500 rpm para sedimentar los GR. Se extrajo el sobrenadante con pipeta Pasteur y se repitió el lavado 2 veces, hasta obtener un sobrenadante limpio. Finalmente se tomaron 500  $\mu$ l de GR y se diluyeron en 10 ml de Solución diluyente de GR.

En una placa de 96 pocillos con fondo en U se colocaron 100  $\mu$ l de diluciones seriadas de ambas proteínas (en solución diluyente de GR) y se agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión de GR. Se incubó durante 1 hora a 37°C, luego 1 hora a temperatura ambiente, y por último toda la noche a 4°C. Se registraron los títulos obtenidos al final de cada incubación (Wadström y Möllby, 1971).

### III.4. RESULTADOS

#### III.4.1. OBTENCIÓN DE LA $\beta$ -TOXINA RECOMBINANTE (rBT)

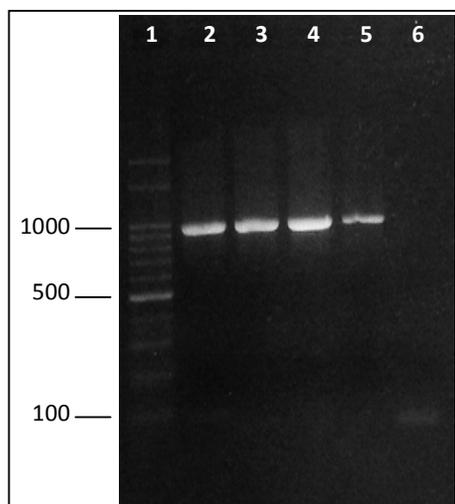
Se evaluó la producción de hemolisinas en 10 cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovinas en el Laboratorio de Microbiología del A.I.P.A. La cepa 226, aislada de un caso de mastitis subclínica en la provincia de Córdoba, mostró producción de  $\beta$ -toxina, pero no de  $\alpha$  ni  $\delta$  toxinas (Figura 11), por lo cual fue seleccionada para la obtención de la proteína de interés.



**Figura 11.** Evaluación de la producción de hemolisinas en cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovinas.

**Referencias:** Vertical izquierdo, *C. pseudotuberculosis*; Vertical derecho, *S. agalactiae*; Horizontal superior, cepa Reynolds productora de  $\alpha$  y  $\beta$  toxinas; Horizontal inferior, cepa 226 productora de  $\beta$ -toxina.

Se extrajo el ADN genómico de la cepa 226 y se utilizó como molde para la amplificación por PCR de la secuencia génica codificante para la  $\beta$ -toxina de *S. aureus*. Luego de las reacciones de amplificación, se obtuvo un fragmento de 1.022 pb, correspondiente al gen completo de la  $\beta$ -toxina de *S. aureus* y los sitios de restricción BamHI – EcoRI, insertados en los extremos 5' y 3', respectivamente (Figura 12). El fragmento amplificado se clonó en el vector pET32a y con la construcción obtenida se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3). La identidad de la secuencia clonada se analizó mediante secuenciación automática y se comparó con la secuencia reportada en GenBank. Se observó un 98,3% identidad entre las mismas a nivel nucleotídico, y un 100% de identidad a nivel de proteína (Ver Anexo II). Se registraron 17 sustituciones de nucleótidos, las cuales en su totalidad, se localizaron sobre la tercera base del codón, dando lugar a mutaciones silenciosas. La secuencia obtenida fue enviada a la base de datos GenBank y se le asignó el N° de acceso KC242859.



**Figura 12.** Amplificación del fragmento codificante de la  $\beta$ -toxina de *S. aureus*.

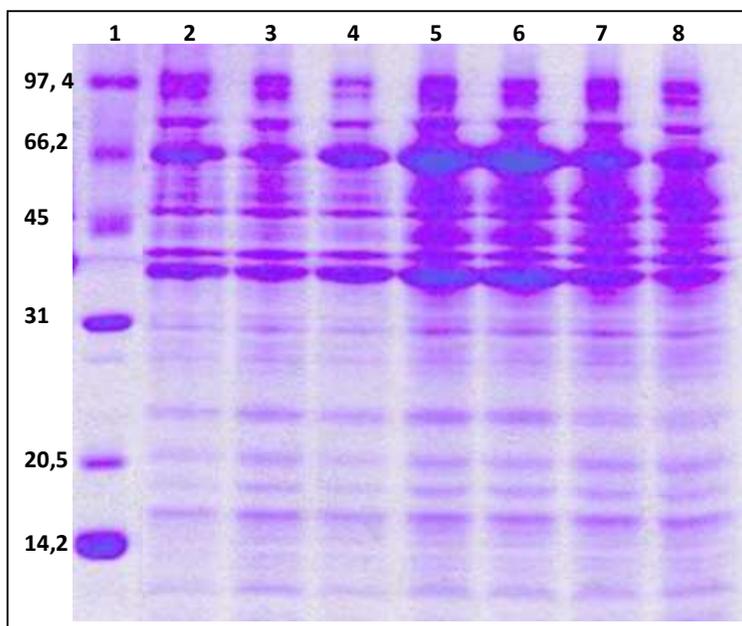
Evaluación en gel de agarosa al 1% de los productos de reacción obtenidos por PCR a partir de ADN genómico de *S. aureus*. Líneas: 1) Marcadores de tamaño de fragmento (100 bp ladder, Productos Bio-Lógicos); 2 y 3) Producto de la reacción de PCR a partir de ADN genómico de la cepa de *S. aureus* Reynolds; 4 y 5) Producto de la reacción de PCR a partir de ADN genómico de la cepa de *S. aureus* 226; 6) Blanco de reacción.

Para la obtención de la  $\beta$ -toxina recombinante (rBT), se realizó una puesta a punto de la inducción de la expresión, utilizando lactosa e IPTG como inductores, y bajo diferentes condiciones (Tabla 7). Los resultados se visualizaron en un SDS-PAGE y compararon con un extracto de células sin inducir.

Inductor	Condiciones de incubación	Concentración
Lactosa	4 horas – 37°C	15 mM
		7,5 mM
	ON - TA	7,5 mM
		3,75 mM
IPTG	4 horas – 37°C	1 mM
		1 mM
	ON - TA	0,2 mM

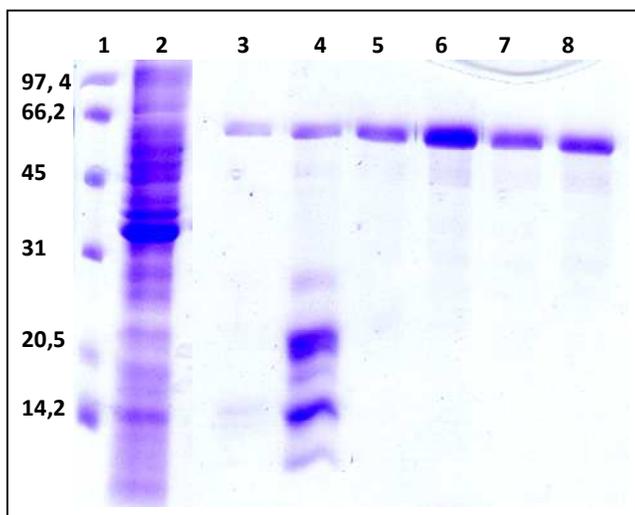
**Tabla 7:** Descripción de los diferentes inductores y condiciones de incubación de los cultivos ensayados para la optimización de la expresión de la  $\beta$ -toxina recombinante de *S. aureus*.

En todas las condiciones ensayadas se observó una banda de sobreexpresión de aproximadamente 60 kDa, correspondiente a la proteína de fusión TRX (aportada por el vector de expresión)-  $\beta$ -toxina. Sin embargo, el mejor rendimiento de rBT se obtuvo con el agregado de 7,5 mM de lactosa al cultivo e incubando durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación (Figura 13).



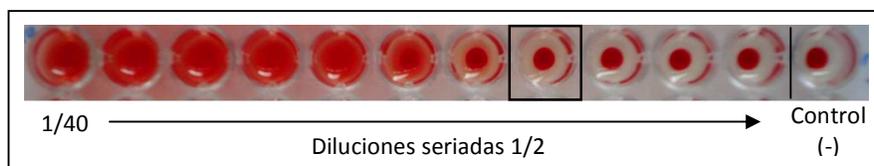
**Figura 13.** Inducción de la expresión de la rBT bajo diferentes condiciones. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15 %, teñido con Azul de Coomasie. Líneas: 1) Marcador de Peso Molecular (Bio-Rad); 2 y 3) 7,5 mM y 15 mM de lactosa con 4 horas de incubación a 37°C; 4) 1mM de IPTG con 4 horas de incubación a 37°C; 5 y 6) 3,75 mM y 7,5 mM de lactosa con incubación ON a TA; 7 y 8) 0,2 mM y 1 mM de IPTG con incubación ON a TA.

Se realizó entonces una segunda inducción de la expresión, esta vez partiendo de mayores cantidades de cultivo. Para la purificación de la proteína, se trabajó en condiciones desnaturalizantes, mediante el agregado de urea 4M a la solución de siembra, de forma de favorecer el pegado de la proteína a la matriz. La elución se realizó con 4 soluciones, conteniendo cantidades crecientes de imidazol. Las diferentes fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 14). No se obtuvieron cantidades detectables de proteína al eluir con la solución SE1 (No mostrado). Luego de la elución con SE2, 3 y 4 se obtuvieron fracciones conteniendo proteína purificada. Se recolectaron las 2 últimas fracciones por ser las que contenían mayor concentración de rBT y menor presencia de impurezas. Con esta metodología se logró obtener la proteína en elevada concentración y altamente purificada, con un rendimiento de 4 mg de proteína por litro de cultivo. Para evitar la formación de agregados y precipitación de la proteína, inmediatamente después de finalizada la purificación, la misma se diluyó 10 veces en PBS, logrando así mantenerla soluble y facilitando su conservación.



**Figura 14.** Purificación de la rBT en condiciones desnaturalizantes. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%, teñido con Azul de Coomasie. **Líneas:** 1) Marcador de Peso Molecular (Bio-Rad); 2) Flow through; 3 y 4) Extractos recuperados luego de la elución con SE2; 5 y 6) Extractos recuperados luego de la elución con SE3; 7 y 8) Extractos recuperados luego de la elución con SE4.

Finalmente se evaluó la actividad hemolítica de la rBT obtenida frente a glóbulos rojos de carnero. Se partió de una dilución 1/40 de toxina purificada, seguida de diluciones seriadas al medio, en placa de 96 pocillos. Luego de las incubaciones correspondientes, se observó un título de hemólisis de 1/5120 para la  $\beta$ -toxina recombinante (Figura 15).



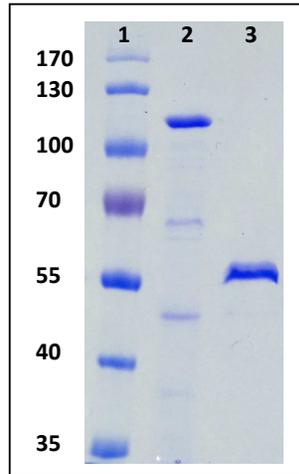
**Figura 15.** Evaluación de la actividad hemolítica de la rBT frente a GR de carnero.

#### III.4.2. OBTENCIÓN DE LOS ANTÍGENOS FnBP-A Y ClfA RECOMBINANTES

Mediante la inducción con IPTG de cultivos de *E. coli* conteniendo los fragmentos codificantes correspondientes, se obtuvieron 2 péptidos de 137 aa y 519 aa, de las proteínas FnBP-A y ClfA, respectivamente. Los mismos se expresaron como proteínas de fusión a TRX, aportada por el vector de expresión. El péptido de ClfA (rClfA) corresponde a la región A 5' de la proteína, que contiene el dominio de unión a fibrinógeno; mientras que el péptido de FnBP-A (rFnBPA) contiene los 3 dominios de unión a fibronectina consecutivos: D1, D2, D3.

En ambos casos, luego de la purificación de los antígenos por columna de afinidad, se recolectaron las fracciones obtenidas a partir de la elución con las soluciones SE3 y SE4, por ser

las que presentaron mayores concentraciones de proteína de interés y menor cantidad de impurezas (No mostrado). El rendimiento de producción de proteína por 100 ml de cultivo inducido fue de 4,3 mg para rClfA y 6 mg para rFnBPA, (Figura 16). Las muestras se conservaron diluidas 1/10 en PBS para evitar su precipitación.



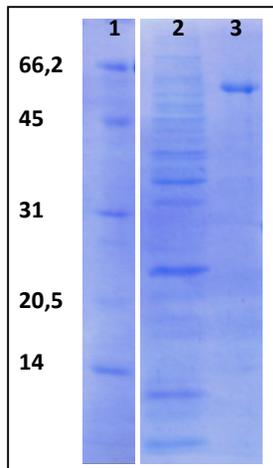
**Figura 16.** Obtención de los antígenos recombinantes ClfA y FnBP-A de *S. aureus*.

Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%, teñido con Azul de Coomasie.

**Líneas:** 1) Marcador de Peso Molecular (Fermentas); 2) rClfA; 3) rFnBPA.

### III.4.3. OBTENCIÓN DE LA $\beta$ -TOXINA NATIVA (nBT)

Para la purificación parcial de la nBT de *S. aureus* se trabajó con la misma cepa de campo utilizada para la obtención de la rBT; cepa 226. Mediante centrifugaciones se separó el sobrenadante de un cultivo de 7 horas del microorganismo, el cual luego se precipitó con alcohol para la obtención de los componentes proteicos extracelulares. La presencia de toxina en el extracto parcialmente purificado se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 17). Se detectó la presencia de una banda de aproximadamente 35 kDa, correspondiente al PM de la nBT, aunque también se observaron otras bandas de diversos tamaños, correspondientes a componentes extracelulares del microorganismo.



**Figura 17.** Purificación de la nBT de sobrenadante de cultivo de *S. aureus*. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%, teñido con Azul de Coomasie. **Líneas:** 1) Marcador de Peso Molecular (Bio-Rad); 2) extracto proteico obtenido a partir de precipitaciones alcohólicas de sobrenadante de cultivo de *S. aureus*; 3) rBT purificada.



**Figura 18.** Evaluación de la actividad hemolítica de la nBT frente a GR de carnero.

La actividad del extracto conteniendo la nBT se evaluó mediante ensayos de hemólisis con GR de carnero (Figura 18). Se trabajó con una dilución 1/10, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas al medio, en placa de 96 pocillos. Se obtuvo un título de actividad de 1/2560.

### III.5. DISCUSIÓN

La  $\beta$ -toxina de *S. aureus*, es considerada uno de los principales factores de virulencia del microorganismo, indicado no solo por su presencia en gran parte de las cepas aisladas de IIM bovinas (Aarestrup y col., 1999; Larsen y col., 2002; Ote y col., 2011), sino también por sus demostrados efectos tóxicos hacia células del sistema inmune (Marshall y col., 2000; Huseby y col., 2007) y epiteliales de glándula mamaria de diferentes especies (Bramley y col., 1989; Calvino y col., 1993; Cifrian y col., 1996a).

Diversos autores han reportado las dificultades en la obtención de la  $\beta$ -toxina a partir de sobrenadantes de cultivo de *S. aureus*, debido a la presencia de impurezas provenientes de otros productos extracelulares (Calvino y col., 1993; Cifrian y col., 1996a). Estas preparaciones contienen una baja concentración de proteína específica, que puede, en muchas ocasiones, complicar el análisis de los resultados. Otro obstáculo presentado en la purificación de la toxina nativa es que aún no ha sido exactamente dilucidado el momento en la cual ocurre la máxima expresión de la misma. Esto llevó a la aplicación de diferentes metodologías de obtención, con resultados también diversos. Por ejemplo, las preparaciones obtenidas de sobrenadantes de cultivos exponenciales de *S. aureus* mostraron títulos de actividad hemolítica 1.000 veces mayores a los extractos purificados de cultivos estacionarios de 48 horas (Calvino y col., 1993; Cifrian y col., 1996a). En el presente estudio se trabajó con sobrenadante de 7 horas de cultivo de una cepa de *S. aureus* que presentó  $\beta$ -hemólisis pero no  $\alpha$  ni  $\delta$ . El extracto crudo obtenido presentó una importante cantidad de bandas al ser evaluado por SDS-PAGE, además de la de interés de 35 kDa. A pesar de haber seguido la metodología de purificación reportada por Calvino y col. (1993), la actividad hemolítica del producto de extracción resultó 10 veces menor a la descrita previamente por los autores. Esto podría atribuirse a la utilización de cepas distintas de *S. aureus*, así como a una diferencia en el proceso de conservación del extracto obtenido, durante el cual se ha reportado una disminución de la actividad hemolítica de la proteína (Calvino y col., 1993). El agregado de aditivos estabilizadores, así como la preservación a menores temperaturas han sido reportados como eficientes para la estabilización de proteínas y disminución de la pérdida de la actividad biológica (Simpson, 2010).

En este estudio se propuso también obtener la  $\beta$ -toxina de *S. aureus* de forma recombinante, presentando esta metodología la ventaja de ser fácilmente escalable y de producir buenos rendimientos de proteína altamente purificada. Para ello se trabajó con una cepa aislada de un caso de mastitis bovina que mostró solamente presencia de hemolisina

beta en agar sangre. Los análisis de secuenciación nucleotídica del gen codificante para la  $\beta$ -toxina mostraron un alto porcentaje de identidad con la cepa reportada, que había sido seleccionada para el diseño de oligonucleótidos para la amplificación (Projan y col., 1989). Las mínimas variaciones encontradas no condujeron, sin embargo, a alteraciones a nivel aminoacídico, indicando una conservación en la estructura de la proteína. De hecho, las secuencias aminoacídicas codificadas por el gen de  $\beta$ -toxina (*hlyB*) en las cepas cuyos genomas han sido secuenciados son exactamente idénticas; excepto casos aislados de mutantes generadas por inserciones de fagos (Coleman y col., 1991). Incluso, la comparación del sitio activo de las  $\beta$ -toxinas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, y *S. schleiferi* mostraron una alta conservación en sus residuos aminoacídicos (Huseby y col., 2007). La toxina recombinante obtenida, luego de la expresión en células de *E. coli*, presentó un elevado título de actividad hemolítica frente a glóbulos rojos de carnero, incluso mayores a los observados para la proteína nativa. Estos resultados sugieren que dicha variación no se debería a una diferencia en la funcionalidad de los productos obtenidos sino simplemente a una disparidad en la concentración de proteína específica en los preparados.

Las proteínas superficiales FnBP y Clf han sido descritas como factores involucrados en la patogénesis de *S. aureus* en cuanto a su capacidad de promover la invasión celular y de inhibir la fagocitosis por PMN (Fowler y col., 2000; Higgins y col., 2006; Hair y col., 2010). Se ha propuesto que estas moléculas se expresarían principalmente durante la fase temprana de crecimiento exponencial del microorganismo. Ni' Eidhin y col. (1998) demostraron que el factor de agregación ClfB se expresaría sólo durante las 2 primeras horas del cultivo *in vitro* de *S. aureus*, y luego sufriría una degradación proteolítica (Ni' Eidhin y col., 1998). Sin embargo, el ClfA sería menos susceptible a la acción de proteasas, ya que se ha observado su presencia durante toda la fase del ciclo de crecimiento del microorganismo (Hartford y col., 1997). En cuanto a las proteínas de unión a Fn, estudios realizados con cepas mutantes permitieron demostrar que la expresión de los genes *fnb* también ocurriría solamente durante la etapa temprana de crecimiento exponencial, y que el mecanismo estaría regulado por el sistema *agr* (Saravia-Otten y col., 1997). Sin embargo, se han evidenciado variaciones en la expresión *in vivo* de estas moléculas, las cuales estarían influenciadas por características intrínsecas de la cepa y por el microambiente en el cual el microorganismo se está desarrollando (Nanra y col., 2009). Estas discordancias, sumadas a la complejidad de la estandarización de las metodologías de purificación de las proteínas en su forma nativa, hacen que la obtención de las mismas por técnicas de ADN recombinante sea de gran utilidad. En este trabajo se utilizó un clon recombinante disponible en el laboratorio (Pujato y col., 2011) a partir del cual se obtuvo un

fragmento peptídico de ClfA compuesto por los aminoácidos 40 a 559, el cual se ha descrito, contiene el dominio unión a fibrinógeno (Hartford y col., 1997). Dicha fracción ha sido previamente evaluada en diferentes modelos animales, en los cuales la inmunización con el fragmento recombinante, o plásmidos que lo codifican, generaron una fuerte respuesta de anticuerpos específicos, capaces de favorecer la fagocitosis, disminuir la invasión celular y reducir el número y severidad de las infecciones por *S. aureus*, luego de un desafío experimental (Josefsson y col., 2001; Brouillette y col., 2003; Gong y col., 2010). En cuanto a la FnBP, se han descrito 3 dominios de unión a Fn D1, D2 y D3, que al estar codificados en tándem en el genoma, pueden unirse a la Fn con alta afinidad (Signas y col., 1989). A partir de un clon previamente obtenido en nuestro laboratorio, se expresó un péptido recombinante conteniendo el dominio de unión a Fn D1-D3 de la FnBP-A de *S. aureus*. La funcionalidad e inmunogenicidad de esta región de la molécula había sido previamente reportada por otros autores en diferentes modelo murinos, mostrando la capacidad de la misma de generar agregados bacterianos, atracción de PMN y macrófagos y anticuerpos con capacidad opsonizante (Rozalska y Wadström, 1992; Mamo y col., 1995).

Como conclusión, se logró obtener la  $\beta$ -toxina de *S. aureus* tanto de manera recombinante como en su forma nativa, mostrando ambas preparaciones actividad hemolítica para GR de carnero. A partir de clones disponibles en el laboratorio se obtuvieron también fragmentos recombinantes de las proteínas ClfA y FnBP-A de *S. aureus*.

## CAPÍTULO IV. ENSAYO II DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS: COMPARACIÓN DE INMUNÓGENOS BASADOS EN CÉLULAS ENTERAS O LISADAS DE *S. aureus*.

### IV.1. MARCO TEÓRICO

Dentro de las vacunas experimentales ensayadas en los últimos años por diversos grupos de investigación, se encuentran las basadas en lisados de células de *S. aureus*, obtenidos por diversos métodos. De hecho, dos de los desarrollos que han alcanzado la etapa de comercialización, se encuentran preparados con lisados de varias cepas de *S. aureus* y formulados con diferentes adyuvantes. Uno de ellos es la vacuna Lysigin™ (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc, St Joseph MO, EE.UU.), que contiene un lisado de 5 cepas capsuladas de *S. aureus* (1 cepa CP5, 2 cepas CP8 y 2 cepas productoras del polisacárido de superficie 336) (Ma y col., 2004), formuladas con Al(OH)<sub>3</sub>. En estudios realizados en terneras, la aplicación de múltiples dosis de la misma permitió una reducción significativa del número de nuevas IIM por *S. aureus* (Nickerson y col., 1999). Si bien la inmunización de vaquillonas preñadas con la vacuna indujo la producción de anticuerpos específicos en leche (Luby y col., 2007), los resultados obtenidos en bovinos adultos, en ensayos a campo o con desafíos experimentales, no han sido concluyentes, y sólo muestran cierta efectividad en la reducción de la severidad y duración de la infección (Middleton y col., 2006; Middleton 2009). La vacuna MASTIVAC®, desarrollada en Israel, se compone de un lisado de dos cepas de *S. aureus* (una alfa-hemolítica y una alfa y beta hemolítica) y sobrenadante de cultivo de una tercera cepa (no hemolítica), aisladas de mastitis bovinas (Leitner y col, 2003b). Trabajos realizados en vaquillonas preñadas o vacas en lactancia reflejaron la capacidad de la formulación de inducir anticuerpos específicos en sangre (Leitner y col., 2003c), así como de reducir el número de cuartos infectados por *S. aureus* luego de un desafío experimental (Leitner y col., 2003a).

O' Brien y col. (2001), desarrollaron un inmunógeno experimental preparado sobre la base de células lisadas de una cepa capsulada de *S. aureus*, incorporada en microesferas y formulado con dos adyuvantes diferentes. La inoculación del mismo en vacas no lactantes, indujo una respuesta de anticuerpos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> específicos en sangre capaces de favorecer la fagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos e inhibir la adherencia de este organismo a células epiteliales mamarias *in vitro* (O' Brien y col., 2001). Prenafeta y colaboradores (2010) inmunizaron vaquillonas preñadas con lisados obtenidos por tratamiento con calor de dos cepas de *S. aureus* con diferente contenido de SAAC (complejo antigénico asociado a *slime*).

Los animales inmunizados con la cepa con alta producción de SAAC, desarrollaron altos niveles de IgG, IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> en sangre e IgG en leche. Además, presentaron menores recuentos de bacterias y menor severidad en la sintomatología clínica luego de una IIM experimental con una cepa heteróloga de *S. aureus* (Prenafeta y col., 2010).

Los resultados obtenidos en el ensayo de inmunización descrito en el Capítulo II, demostraron la capacidad de un inmunógeno experimental compuesto por células enteras de *S. aureus* y formulado con Iscom Matrix<sup>TM</sup>, de lograr una fuerte producción de anticuerpos específicos, con una aumentada capacidad de fagocitosis, y regulación positiva de citoquinas pro-inflamatorias y regulatorias, al ser comparado con una formulación con un adyuvante tradicional. Si bien la capacidad de estos complejos inmunoestimulantes de inducir fuertes respuestas humorales y celulares al ser incorporados en vacunas en distintas especies ha sido apropiadamente revisada (Sun y col., 2009), estas formulaciones incluyen, principalmente, antígenos definidos, y no existe experiencia en el uso de los mismos para la formulación de bacterias enteras o lisadas.

## IV.2. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Dado que las vacunas disponibles comercialmente en la actualidad están compuestas principalmente de lisados de diferentes cepas de *S. aureus*, seleccionadas sobre la base de distintas características del microorganismo, y que no existe información acerca del uso de Iscom Matrix™ en la formulación de vacunas compuestas por lisados bacterianos, la propuesta de esta segunda etapa del trabajo fue comparar la respuesta inmune obtenida al inmunizar bovinos con una bacterina o un lisado de *S. aureus* CP5, ambos formulados con Iscom Matrix™. Por otra parte, conociendo que los métodos de obtención de preparaciones de lisados o bacterinas de microorganismos pueden generar transformaciones en proteínas consideradas relevantes desde el punto de vista inmunogénico, se propuso además evaluar las respuestas humorales dirigidas hacia factores de virulencia representativos de *S. aureus*.

- **Objetivos específicos:**

1. Desarrollar un esquema de inmunización de vaquillonas preñadas con una bacterina o un lisado de *S. aureus* CP5, formulados con Iscom Matrix™.
2. Evaluar la respuesta inmune innata y humoral específica inducida por las vacunaciones, hacia los componentes vacunales así como hacia factores de virulencia de *S. aureus*.
3. Evaluar el efecto de los anticuerpos generados por la vacunación en la opsonización de *S. aureus* y fagocitosis por PMN y en la inhibición de la invasión a células epiteliales mamarias.

### **IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### **IV.3.1. INMUNIZACIÓN Y MUESTREO**

##### **IV.3.1.1. Preparación de bacterina de *S. aureus***

Se cultivó *S. aureus* Reynolds en medio en Agar Salado durante toda la noche a 37°C, para favorecer la expresión de cápsula (Fattom y col., 1990). El desarrollo obtenido se resuspendió en PBS estéril y se inactivó con 0,5% de formalina por 24 horas a 37°C. Se realizaron 3 lavados mediante centrifugaciones de 10 minutos a 5.000 rpm para eliminar el exceso de formol. Finalmente el pellet de células se resuspendió en PBS estéril a concentración final de  $1.10^9$  ufc/ml.

##### **IV.3.1.2. Preparación de lisado de *S. aureus***

Se cultivó *S. aureus* Reynolds en Agar Salado durante toda la noche a 37°C (Fattom y col., 1990). Las bacterias se resuspendieron en PBS estéril a concentración  $1.10^9$  ufc/ml; se agregó 35 U de lisostafina (Sigma) y se incubó durante 6 horas a 37°C en agitación (100 rpm). La reacción se monitoreó midiendo periódicamente Abs.  $DO_{600}$ . Transcurrida la incubación se inactivó la lisostafina mediante la incubación en baño de agua a 75°C por 15 minutos. Cincuenta  $\mu$ l de la suspensión se sembraron en placas con Agar Sangre y se incubaron toda la noche a 37°C para confirmar la lisis total de las células. Finalmente, se pasó la mezcla por un filtro de 0,45  $\mu$ m para asegurar la remoción total de bacterias intactas (O'Brien y col., 2001).

##### **IV.3.1.3. Formulación de las vacunas**

Las suspensiones de los inmunógenos se formularon con 2mg/ml de Iscom Matrix™ y se mezclaron por inversión. Se preparó también una formulación de PBS y adyuvante como placebo. Todas las preparaciones fueron sometidas a controles de esterilidad mediante la siembra de 100  $\mu$ l de las mismas en Agar Sangre e incubación por 48 horas a 37°C. Las preparaciones se conservaron en heladera hasta su utilización, por no más de 72 horas.

##### **IV.3.1.4. Animales**

Se utilizaron 35 vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación,

pertenecientes al rodeo experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA. Los animales se mantuvieron alimentados con pasturas a base de alfalfa suplementada con grano de maíz desde los 60 hasta los 30 días previos al parto. Luego, se alimentaron con TMR basada en silo de maíz hasta el parto. Luego del parto estuvieron bajo condiciones de pastoreo (alfalfa) recibiendo TMR suplementada con silo de maíz. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigaciones Agropecuarias y Enseñanza (FASS, 1999).

#### **IV.3.1.5. Inmunización y muestreo**

Los animales se dividieron al azar en 3 grupos, y cada uno de ellos recibió una de las siguientes formulaciones:

*Grupo Control:* (1 ml de solución fisiológica estéril + 2 mg Iscom Matrix™)/dosis

*Grupo Bacterina:* (1.10<sup>9</sup> ufc de *S. aureus* inactivado + 2 mg Iscom Matrix™)/dosis

*Grupo Lisado:* (1.10<sup>9</sup> ufc de *S. aureus* lisado + 2 mg Iscom Matrix™)/dosis

Se aplicaron dos inyecciones subcutáneas en el área del ganglio supramamario de acuerdo con descripciones previas (Camussone y col., 2010), 45 y 15 días previos a la fecha estimada de parto. Al momento de la segunda dosis vacunal las glándulas mamarias de todos los animales incluidos en los experimentos se examinaron clínicamente por palpación y se tomaron muestras de secreción pre-parto para determinar la presencia de infecciones intramamarias por *S. aureus*. Las muestras fueron recolectadas en forma aséptica siguiendo procedimientos estándar (Oliver y col., 2004) y luego del muestreo los pezones de las vaquillonas se sumergieron en una solución antiséptica conteniendo 0,5% de yodo disponible. A las 31 semanas posteriores al parto se aplicó una tercera dosis de refuerzo, utilizando la misma vía de administración del inmunógeno. Solo fueron incluidos en el ensayo animales libres de IIM por *S. aureus* y sin signos clínicos de inflamación.

Antes del comienzo del protocolo de inmunización se colectó una muestra de sangre por punción en la vena coccígea, lo cual se repitió cada 15 días hasta el día del parto. Dentro de las 24 horas post-parto se tomaron muestras de sangre y de leche de cada cuarto mamario, lo cual se repitió a los 7, 15, 21, 30 y 60 días y a las 31, 32 y 33 semanas (Tabla 8). Una alícuota de leche de cada cuarto mamario fue utilizada para cultivo bacteriológico. Quinientos µl de leche de cada cuarto mamario de las muestras obtenidas a partir del día 7 post-parto se utilizaron para la preparación de muestras compuestas para determinación de anticuerpos. Estas muestras se centrifugaron por 15 minutos a 10.000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes.

Las muestras de sangre se dejaron coagular mediante incubación a temperatura ambiente y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 1.500 rpm por 10 minutos. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. Se controló la aparición de reacciones adversas a los inmunógenos a través de la observación clínica periódica.

Semanas / Tratamiento	-6	-4	-2	0 (parto)	1	2	4	8	31	32	33
Dosis de vacuna	1 <sup>era</sup>		2 <sup>da</sup>						3 <sup>ra</sup>		
Muestras de sangre	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Muestras de leche			x	x	x	x	x	x	x	x	x

**Tabla 8.** Esquema de inmunización y muestreo de sangre y leche de vaquillonas en el ensayo a campo.

#### IV.3.1.6. Análisis bacteriológico de muestras de leche

Para cada una de las instancias de muestreo, se tomaron 10 µl de las muestras obtenidas de cada cuarto mamario de todos los animales en ensayo y se sembraron en un cuadrante de una placa de Agar Sangre. Las mismas se incubaron 18 horas a 37°C para detectar la presencia de organismos de crecimiento rápido. En caso de no observarse desarrollo, se re-incubaron por otras 24 horas (Oliver y col., 2004). La presencia de una colonia de *S. aureus* en Agar Sangre se consideró como identificación positiva; con lo cual el límite de detección fue de 100 ufc/ml. Las vaquillonas que arrojaron un cultivo positivo en cualquier muestra a lo largo del estudio fueron excluidas del mismo. La caracterización de los microorganismos aislados se realizó mediante observación microscópica y sobre la base de reacciones bioquímicas clásicas (Ver sección II.3.1.6.).

### IV.3.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

#### IV.3.2.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano (GBO) con  $1.10^8$  ufc de *S. aureus* Reynolds inactivado con formol,  $1.10^8$  ufc de *S. aureus* Reynolds lisado, 5 µg de CP5, 0,5 µg de rBT, 0,5 µg de rFnBPA, o 0,5 µg de rClfA, según corresponda. Todos los antígenos se resuspendieron en PBS (pH 7,2). Se procedió de acuerdo a la metodología descrita previamente (Ver Sección II.3.3.1.)

Para el análisis comparativo de las respuestas de anticuerpos de los diferentes grupos de tratamiento a través del tiempo, se utilizó un diseño con datos recogidos en una secuencia de

puntos espaciados en el tiempo en forma desigual, empleándose un modelo factorial para los factores tratamiento y tiempo. Las medias de DO obtenidas en los test de ELISA para IgG e IgG<sub>2</sub> de los diferentes grupos de tratamiento, fueron comparadas en cada estación de muestreo por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por el test de Mann-Whitney para detectar diferencias entre pares ( $p < 0,05$ ).

#### **IV.3.2.2. Ensayos de fagocitosis para la evaluación de la capacidad opsónica de los anticuerpos**

Se utilizaron los sueros obtenidos a los 7 días post-parto de todos los animales incluidos en el estudio. Para la marcación de bacterias, purificación de neutrófilos y ensayo de fagocitosis se procedió de igual manera a la descrita previamente (Ver Sección II.3.3.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las muestras se conservaron en buffer de citometría suplementado con 1% de formol hasta 30 días a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por test de Mann-Whitney para detectar diferencias entre pares (Ver Sección II.3.3.2.) ( $p < 0,05$ ).

#### **IV.3.2.3. Ensayos de inhibición de la internalización de *S. aureus* a células epiteliales mamarias bovinas**

##### ***IV.3.2.3.1. Preparación de las bacterias***

Se cultivó *S. aureus* Reynolds en Agar Salado durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en PBS y se llevó la suspensión a una escala de 0,5 Mc Farland (aproximadamente  $1,8 \times 10^9$  ufc/ml). Para el inóculo inicial se preparó una dilución 1/100 de la suspensión anterior en medio de cultivo de células (MCC) sin antibiótico.

##### ***IV.3.2.3.2. Cultivo de células epiteliales mamarias bovinas***

Se utilizó una línea de células epiteliales de glándula mamaria bovina, MAC-T, (Huynh y col., 1991) que ha sido empleada en trabajos previos por miembros de nuestro grupo de trabajo (Calvinho y col., 1996; Calvinho y Oliver, 1998). Dicha línea fue producida mediante la transfección de células alveolares mamarias bovinas con el antígeno T SV-40 (Huynh y col., 1991).

#### **IV.3.2.3.3. Ensayo de internalización**

Las monocapas de las células MAC-T en confluencia se lavaron 3 veces con PBS. Tres ml de la suspensión de *S. aureus* se opsonizaron durante 1 hora a 37°C con los sueros de los animales obtenidos al día 7 posterior al parto. Luego, cada mezcla se agregó a las monocapas de MAC-T crecidas en placas estériles de 24 pocillos con fondo plano (Axygen), utilizando 3 pocillos por cada suero a evaluar. Las mezclas se incubaron durante 2 horas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, previa centrifugación durante 5 minutos a 600g. Luego, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS. Las bacterias extracelulares se eliminaron mediante la incubación con MCC suplementado con Gentamicina (100ug/ml), durante 2 horas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Se lavó nuevamente 2 veces con PBS. Las bacterias internalizadas se liberaron mediante tratamiento de las monocapas con Triton X-100 0,025 % (v/v) por 15 minutos en agitación. Se realizaron 3 diluciones seriadas al décimo de los contenidos de cada pocillo, los cuales se sembraron, por duplicado, en placas con Agar Sangre. Luego de incubar durante 18 horas a 37°C se contó el número de ufc recuperadas.

#### **IV.3.2.3.4. Análisis estadístico**

Las medias de los porcentajes de internalización de bacterias para cada grupo de tratamiento, fueron comparadas por medio de análisis de la varianza para muestras repetidas (ANOVA), seguido por el test de Duncan en caso de obtener diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

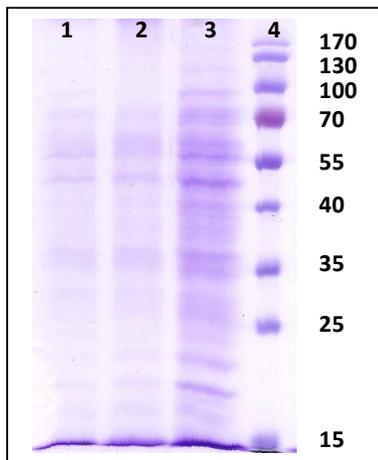
### **IV.3.3. EVALUACIÓN DEL PERFIL DE CITOQUINAS EN ANIMALES INMUNIZADOS**

Luego de transcurridas 24 horas desde la aplicación de la segunda dosis de vacuna, se extrajeron 5 ml de sangre de la vena yugular de 4 animales de cada grupo evaluado, los cuales se transfirieron a tubos estériles conteniendo 500 µl de EDTA 1%. Se centrifugó durante 20 minutos a 1.000 rpm, luego de lo cual el plasma y la fase leucocitaria se transfirieron a un tubo limpio. Se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 1.500 rpm, el plasma se pasó a otro tubo y se conservó a -20°C. El pellet de células se resuspendió en 500 µl de TRizol Reagent (Invitrogen) y se conservó a -80°C.

A partir de las células purificadas se realizó la extracción y posterior transcripción reversa de ARN. Se cuantificaron los niveles de ARNm de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12 p-40, IFN-γ y TNF-α, mediante PCR en Tiempo Real (Rotor Gene Q, Qiagen), utilizando primers específicos (Ver Sección II.3.4.).

#### IV.4. RESULTADOS

Los inmunógenos utilizados en este ensayo consistieron en una suspensión de células enteras inactivadas de *S. aureus* y una fracción soluble preparada sobre la base de células lisadas del microorganismo (Figura 19). El tratamiento enzimático para la lisis celular resultó un 100% eficiente, evidenciado por la ausencia de desarrollo bacteriano, luego del cultivo microbiológico de la suspensión.



**Figura 19.** Obtención de los inmunógenos utilizados en el ensayo de inmunización de vaquillonas preñadas. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%, teñido con Azul de Coomassie. **Líneas:** 1) *S. aureus* sin tratamiento; 2) *S. aureus* inactivado con 0,5% de formalina durante 24 horas; 3) *S. aureus* lisado por tratamiento con lisostafina por 6 horas; 4) Marcador de Peso Molecular (Fermentas).

De los 35 animales involucrados inicialmente en el estudio, 8 fueron excluidos debido a que parieron fuera del rango de fechas estipuladas, 1 animal sufrió aborto y 1 presentó mastitis clínica por *Bacillus cereus* al parto. De esta forma, los grupos finales se conformaron por: 8 vaquillonas en cada uno de los grupos control y bacterina, y 9 vaquillonas en el grupo lisado.

No se detectaron reacciones adversas a la inmunización en ninguno de los animales en estudio. Las vaquillonas parieron, en promedio, 34 y 7 días después de la primera y segunda aplicación de vacuna, respectivamente. Todos los animales se mantuvieron libres de IIM por *S. aureus* durante la totalidad de los muestreos.

#### IV.4.1. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN SANGRE

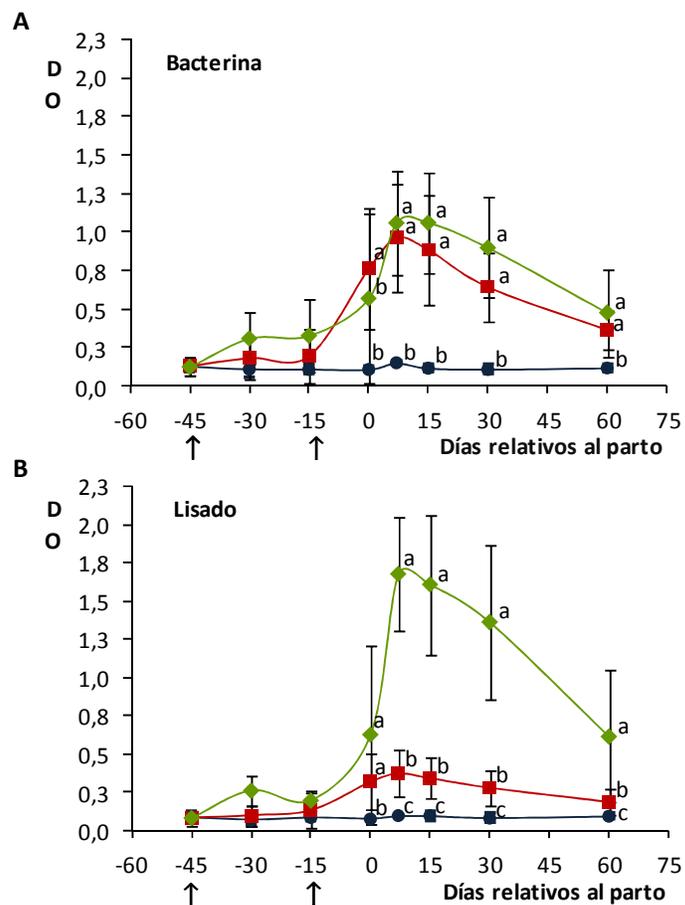
##### IV.4.1.1. IgG anti-bacterina y anti-lisado de *S. aureus*

Se evaluó en sangre la producción de anticuerpos específicos tanto para células enteras como lisadas de *S. aureus*, en todos los animales incluidos en el estudio (Figura 20). No se

encontraron anticuerpos específicos para estos inmunógenos en las muestras pre-inmunes de ninguno de ellos.

Ambos grupos vacunados presentaron niveles de IgG anti-bacterina en sangre significativamente superiores a los presentes en los animales control ( $p < 0,05$ ). Los mismos se mantuvieron significativamente elevados desde el momento del parto, para el grupo bacterina, y desde la primera semana post-parto, para el grupo lisado, hasta la octava semana post-parto ( $p < 0,05$ ). La mayor concentración de esta inmunoglobulina se registró en ambos grupos luego de 7 días de ocurrido el parto, alcanzando valores aproximadamente 6 veces superiores a los del grupo control. Los niveles de anticuerpos entre los grupos inmunizados no resultaron significativamente diferentes entre sí desde la primera semana post-parto hasta el final del período de observación (Figura 20. A).

En cuanto a la determinación de IgG anti-lisado en sangre, si bien al momento del parto, ambos grupos inmunizados habían desarrollado niveles de anticuerpos significativamente superiores a los presentes en los animales del grupo control ( $p < 0,05$ ), el grupo inmunizado con lisado de *S. aureus* fue el que presentó los mayores niveles desde la primera hasta la octava semana post-parto ( $p < 0,05$ ). Los mismos alcanzaron su valor máximo a los 7 días posteriores al parto, superando por 4 y 17 veces a los detectados en los grupos bacterina, o control, respectivamente. Los niveles de IgG anti-lisado en los animales inmunizados con bacterina se mantuvieron significativamente elevados respecto de los animales control, desde la primera hasta la octava semana post-parto ( $p < 0,05$ ) (Figura 20.B).



**Figura 20.** Niveles de IgG específica anti-bacterina (A) y anti-lisado (B) de *S. aureus*, en sangre de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (◆) o control (●). Las flechas representan los momentos de inmunización. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

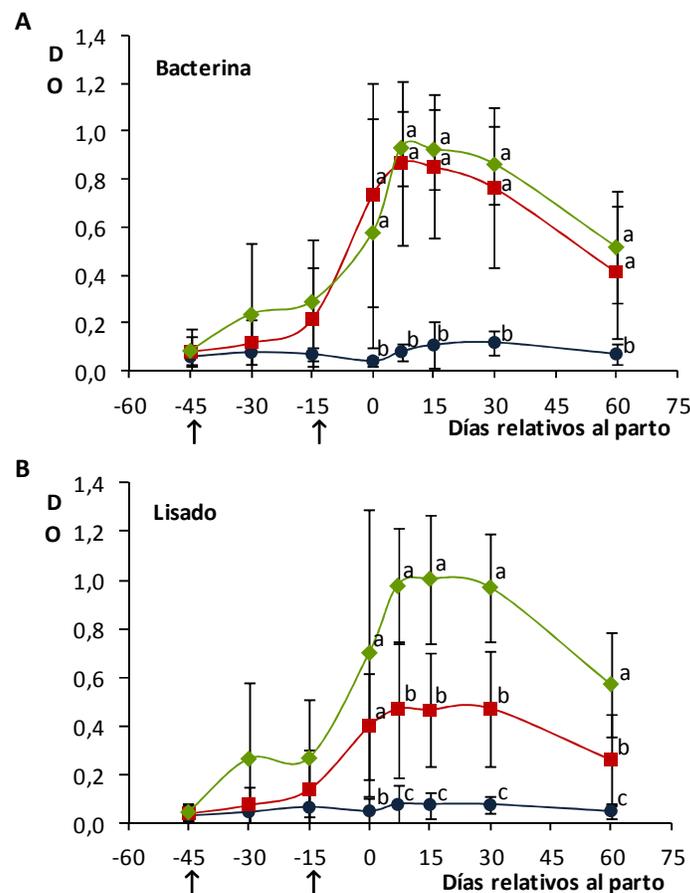
#### IV.4.1.2. IgG<sub>2</sub> anti-bacterina y anti-lisado de *S. aureus*

Se evaluó la presencia de IgG<sub>2</sub> específica para ambos inmunógenos, en todos los sueros de todos los animales en estudio. No se observaron niveles detectables de esta subclase en ninguna de las muestras pre-inmunes evaluadas (Figura 21).

Durante el período transcurrido desde las 24 horas hasta los 60 días post-parto, ambos grupos inmunizados desarrollaron niveles similares de IgG<sub>2</sub> anti-bacterina en sangre, los cuales resultaron significativamente superiores a los detectados en el grupo control ( $p < 0,05$ ) (Figura 21.A.). La máxima producción de estos anticuerpos se alcanzó, en ambos grupos, en la primera

semana posterior al parto, alcanzando valores que superaron por aproximadamente 10 veces a los hallados en los animales control.

Para el caso de los niveles de IgG<sub>2</sub> anti-lisado en sangre, en ambos grupos vacunados superaron significativamente a los presentes en los animales control ( $p < 0,05$ ), desde las 24 horas hasta la octava semana post-parto. A partir de los 7 días posteriores al parto, los niveles de esta subclase en los animales inmunizados con lisado bacteriano se diferenciaron de los detectados para el grupo bacterina ( $p < 0,05$ ), alcanzando valores máximos que superaron por más de 2 y 10 veces a los obtenidos para los animales inmunizados con bacterina o controles, respectivamente (Figura 21.B.).

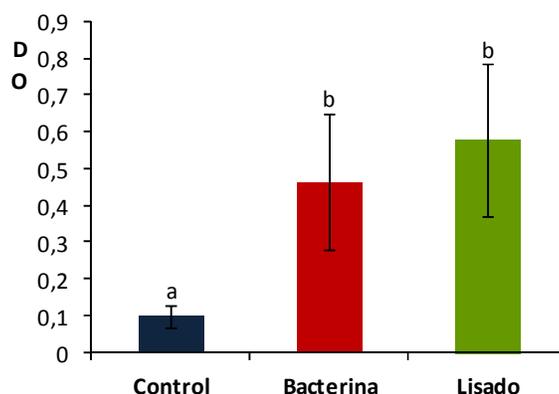


**Figura 21.** Niveles de IgG<sub>2</sub> específica anti-bacterina (A) y anti-lisado (B) de *S. aureus*, en sangre de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (◆) o control (●). Las flechas representan los momentos de inmunización. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4.1.3. Respuesta de IgG frente a determinantes antigénicos de *S. aureus*

Para conocer qué determinantes antigénicos de *S. aureus* son expuestos al huésped cuando se inoculan células enteras o lisadas del microorganismo, se evaluó la producción de anticuerpos específicos para las moléculas recombinantes  $\beta$ -toxina, ClfA y FnBP-A, obtenidas en capítulo anterior de este trabajo, y polisacárido capsular 5 purificado. Para la realización de estos ensayos se utilizaron los sueros obtenidos en el día 7 post-parto de todos los animales estudiados.

Ambos grupos inmunizados presentaron niveles de IgG anti-CP5 al día 7 post-parto significativamente superiores a los detectados en animales control ( $p < 0,05$ ), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 22). No se evidenciaron niveles detectables de IgG específica para el resto de los antígenos evaluados.



**Figura 22.** Niveles de IgG específica anti-CP5 en muestras de sangre tomadas a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ o control. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4.2. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN LECHE

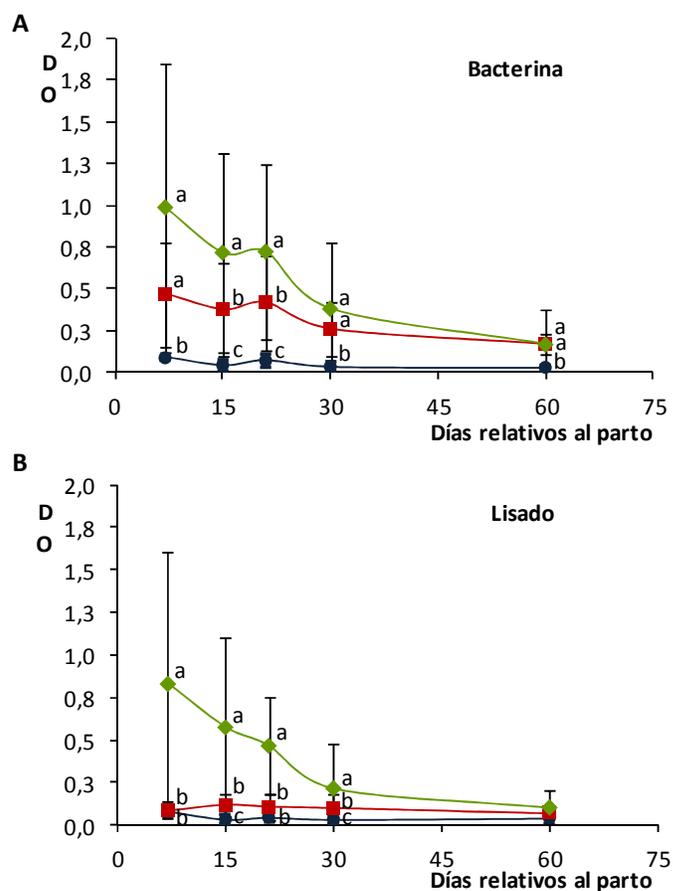
Se evaluó la capacidad de las formulaciones de inducir la producción de anticuerpos específicos en leche, IgG e IgG<sub>2</sub>, en todos los animales en estudio (Figura 23).

Los animales inmunizados con la formulación a base de lisado de *S. aureus* presentaron los mayores niveles de IgG anti-bacterina en suero de leche (Figura 23.A). Estos valores alcanzaron a duplicar a los obtenidos para los animales inmunizados con bacterina, siendo esta diferencia estadísticamente significativa para las muestras tomadas a los 15 y 21 días posteriores al parto

( $p < 0,05$ ). Además, los valores máximos detectados en este grupo, obtenidos durante la primera semana de estudio, superaron por más de 10 veces a los obtenidos para el grupo control. Por su parte, los niveles de IgG anti-bacterina en leche de los animales del grupo inmunizado con bacterina resultaron significativamente mayores a los del grupo control durante las 8 semanas de observación ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la determinación de IgG anti-lisado en leche, los animales inmunizados con lisado de *S. aureus* desarrollaron los mayores niveles en esta secreción durante las primeras 4 semanas de observación ( $p < 0,05$ ); con valores máximos que superaron por aproximadamente 10 veces a los obtenidos tanto para el grupo inmunizado con bacterina como para el grupo control. Sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de anticuerpos desarrollados por los animales inmunizados con bacterina y los animales control en la segunda y cuarta semanas posteriores al parto ( $p < 0,05$ ) (Figura 23.B). Al final del período de observación, en la octava semana post-parto, los niveles de IgG anti-lisado no difirieron entre los 3 grupos evaluados.

No se detectó IgG<sub>2</sub> anti- *S. aureus* en las muestras de leche de ningún animal de los 3 grupos evaluados.



**Figura 23.** Niveles de IgG específica anti-bacterina **(A)** y anti-lisado **(B)** de *S. aureus* en leche de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (◆) o control (●). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

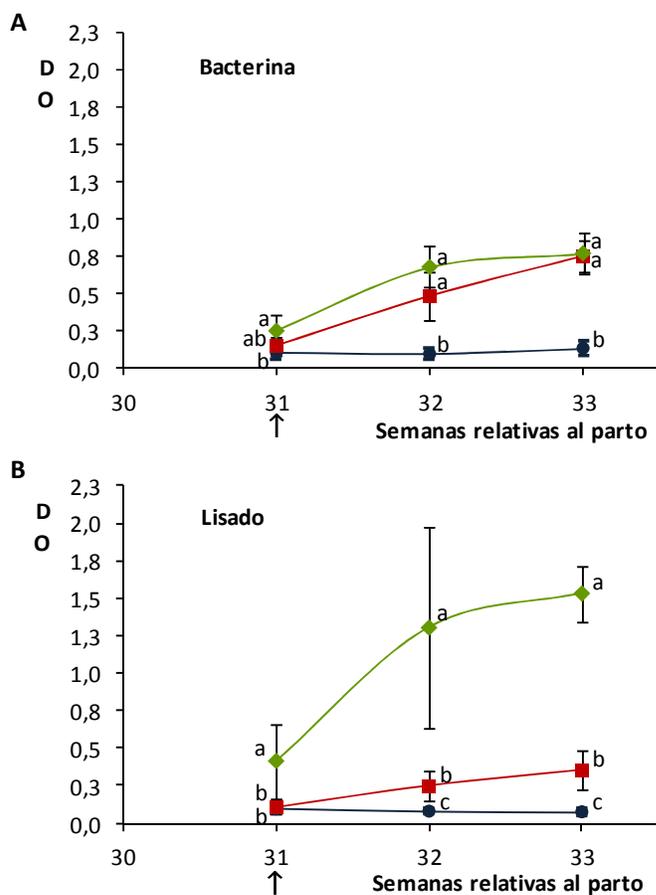
#### IV.4.3. RESPUESTA DE ANTICUERPOS FRENTE A UNA DOSIS REFUERZO DE LOS INMUNÓGENOS EXPERIMENTALES

A fin de evaluar la respuesta de las vaquillonas ante una re-estimulación llegando al final de su período de primera lactancia, a las 31 semanas post-parto se administró una tercera dosis de vacuna. Se tomaron muestras de sangre en el momento de la inoculación y a los 7 y 14 días posteriores, y se evaluó en las mismas la producción de IgG anti-bacterina y anti-lisado de *S. aureus* (Figura 24).

Al momento de la inoculación, los animales del grupo lisado contaban con un mayor nivel de anticuerpos específicos anti-bacterina, remanentes de la inmunización anterior, respecto de

los grupos control ( $p < 0,05$ ) y bacterina ( $p = 0,074$ ). Luego de 7 y 15 días de aplicado el refuerzo, los niveles de IgG anti-bacterina en ambos grupos inmunizados superaban significativamente a los detectados en el grupo control ( $p < 0,05$ ); llegando a alcanzar aproximadamente un 70 % de los niveles máximos registrados al día 7 posterior al parto (Figura 24.A).

En cuanto a la respuesta de IgG anti-lisado, los niveles desarrollados por los animales inmunizados con lisado bacteriano fueron los mayores en los 3 puntos de muestreo ( $p < 0,05$ ). Los valores máximos detectados a los 15 días de aplicado el refuerzo superaron por 4 y 20 veces a los obtenidos para los grupos bacterina o control, respectivamente; y alcanzaron el 90% de la producción máxima observada a los 7 días post-parto. Los animales que recibieron la formulación con bacterina lograron niveles de IgG anti-lisado significativamente mayores a los controles durante las 2 semanas siguientes a la aplicación de la tercera dosis de vacuna ( $p < 0,05$ ), alcanzando niveles de IgG similares a los valores máximos observados a la primera semana post-parto (Figura 24.B).

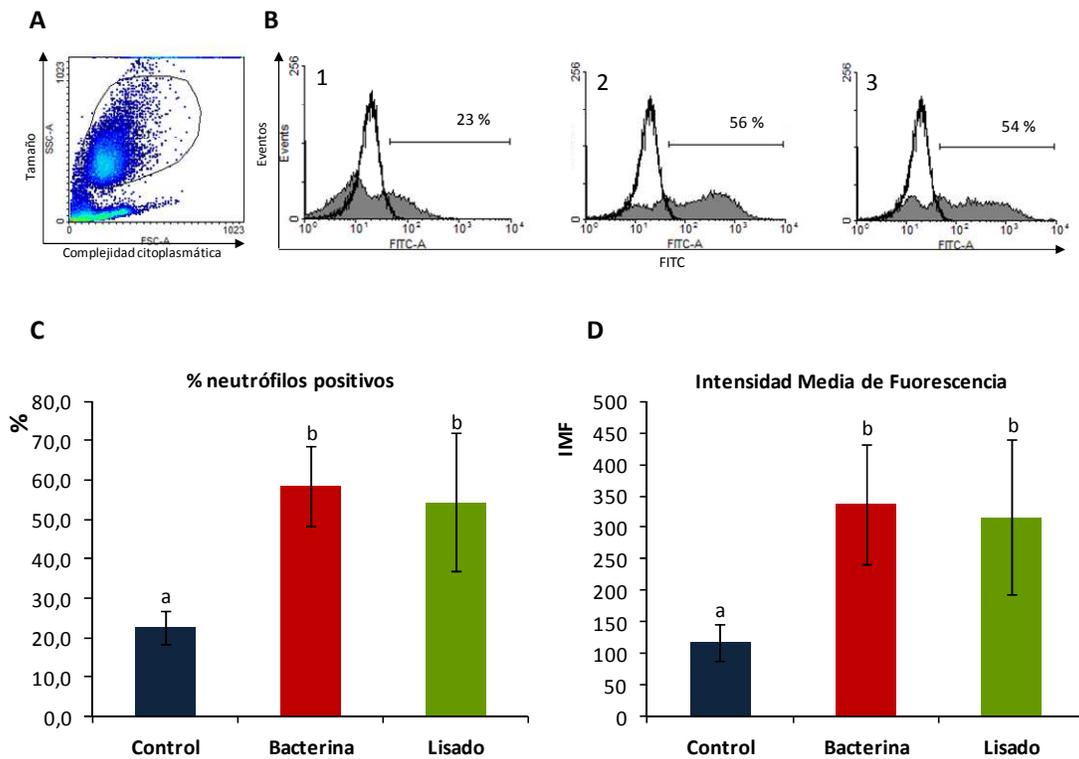


**Figura 24.** Niveles de IgG específica anti-bacterina (A) y anti-lisado (B) en sangre de vaquillonas luego de la aplicación de una tercera dosis de vacuna con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (■), *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (◆) o control (●). Las flechas representan los momentos de inmunización. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4.4. OPSONIZACIÓN Y FAGOCITOSIS POR NEUTRÓFILOS BOVINOS

La funcionalidad de los anticuerpos generados por la vacunación, con respecto a su capacidad de opsonizar bacterias, fue evaluada a partir de las muestras de sangre tomadas al día 7 post-parto, en ensayos de opsonofagocitosis *in vitro*. Luego del análisis mediante citometría de flujo y teniendo en cuenta las características de tamaño y complejidad celular, se seleccionó la población R1 conteniendo a los PMN, (Figura 25.A), sobre la cual se analizó luego la incorporación de bacterias (Figura 25.B). Los sueros de los animales del grupo bacterina y lisado favorecieron la fagocitosis de *S. aureus* por neutrófilos bovinos en un 56,3% ( $\pm 10,2$ ) y

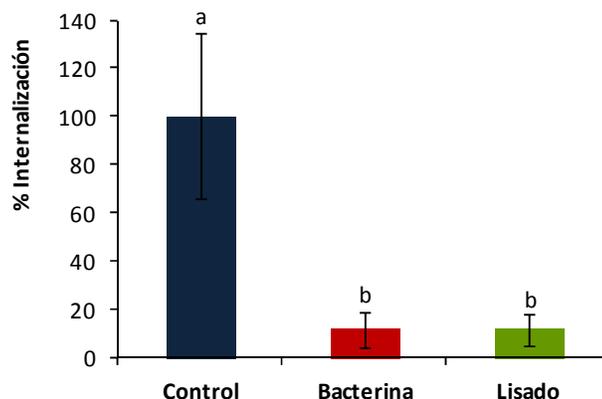
54,2% ( $\pm 17,5$ ), respectivamente. Estos valores, superaron por 2,6 y 2,4 veces, respectivamente, a los obtenidos para el grupo control (22,6%  $\pm 4,3$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 25.C). La Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) se utilizó como estimación de la cantidad de bacterias fagocitadas por célula positiva, resultando también significativamente superior cuando los sueros de los grupos bacteria (337  $\pm 95$ ) o lisado (317  $\pm 124$ ) se utilizaron en la opsonización, en comparación con la obtenida con los sueros de los animales control (117%  $\pm 29$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 25.D).



**Figura 25.** Fagocitosis por neutrófilos bovinos de *S. aureus* Reynolds opsonizado con sueros obtenidos a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ o control. **A)** población de PMN seleccionada sobre la base de tamaño Vs complejidad citoplasmática. **B)** Histogramas representativos mostrando la intensidad de fluorescencia para PMN control incubados con medio de cultivo (vacío) o PMN incubados con sueros de animales inmunizados con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ (2), *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (3) o control (1) (gris). La fagocitosis por PMN se expresó como porcentaje de células positivas (**C**) y como IMF (**D**). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4.5. INHIBICIÓN DE LA INTERNALIZACIÓN EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS

Se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos generados por la vacunación en cuanto a su capacidad de inhibir la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias *in vitro*. Células MAC-T se infectaron con una suspensión de *S. aureus* Reynolds, previamente opsonizada con los sueros obtenidos a los 7 días post-parto de todos los animales incluidos en el estudio. El recuento de ufc obtenido cuando las células MAC-T se enfrentaron a bacterias previamente opsonizadas con los sueros del grupo control, se consideró como 100% de internalización. La previa opsonización de *S. aureus* con los sueros extraídos de las vaquillonas de ambos grupos inmunizados disminuyó significativamente el porcentaje de internalización de las bacterias, en comparación con la incubación con los sueros control ( $p < 0,05$ ). Sólo un 11,3 % y un 11,4 % de las bacterias fueron capaces de invadir a las células epiteliales mamarias, cuando las mismas fueron previamente opsonizadas con los sueros de las vaquillonas de los grupos bacterina o lisado, respectivamente (Figura 26).

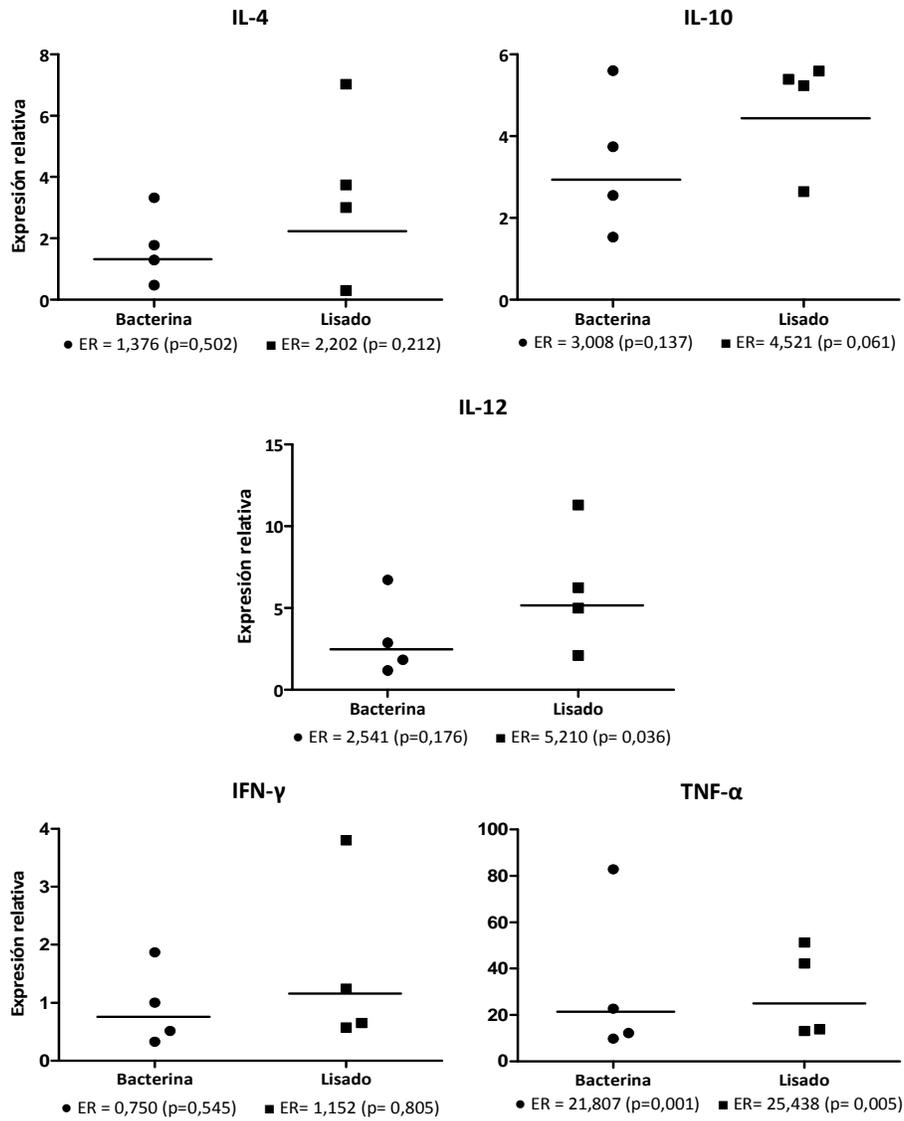


**Figura 26:** Ensayos de inhibición de la invasión de *S. aureus* a células epiteliales mamarias bovinas. Porcentaje de internalización de *S. aureus* Reynolds alcanzado tras la incubación con sueros obtenidos a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ o control. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### IV.4.6. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS

Para comparar los perfiles de respuesta innata desarrollados por las formulaciones ensayadas, se analizaron los niveles de ARNm de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12 p40, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , utilizando  $\beta$ -Actina como gen normalizador. Para esto, luego de transcurridas 24 horas de la aplicación de la segunda dosis de vacuna, a 4 animales de cada uno de los grupos en estudio se les tomó una muestra de sangre periférica por punción en la vena yugular, de las cuales se extrajo ARN total. Los niveles de expresión en animales inmunizados se compararon con los niveles en animales control (Figura 27).

Se detectaron transcritos para todas las citoquinas en todas las muestras evaluadas. Ambos grupos inmunizados presentaron niveles de TNF- $\alpha$  significativamente mayores a los del grupo control (ER bacterina 21,807,  $p < 0,05$ ; ER lisado 25,438,  $p < 0,05$ ). Si bien ambas formulaciones indujeron un aumento en la expresión de IL-12 relativa a los controles, sólo para el caso del grupo inmunizado con lisado de *S. aureus* esta diferencia resultó estadísticamente significativa (ER 5,210;  $p < 0,05$ ). La expresión de IL-10 se vio incrementada en ambos grupos inmunizados, respecto del grupo control, aunque de manera no significativa. La formulación con lisado bacteriano indujo una regulación positiva, aunque no estadísticamente significativa, de IL-4. No se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de IFN- $\gamma$  respecto de los controles en ninguno de los grupos inmunizados; la formulación con lisado de *S. aureus* se asoció con niveles elevados de dicha citoquina en sólo 1 animal.



**Figura 27.** Niveles de expresión de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN-γ y TNF-α relativa al grupo control, observados *in vivo* luego de 24 horas de aplicada la segunda dosis de vacuna, en animales inmunizados con *S. aureus* inactivado en Iscom Matrix™ o con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™. Los valores medios de ER se muestran debajo de cada gráfico y se representan como líneas horizontales.

#### IV.5. DISCUSIÓN

No existen reportes previos sobre el uso de los adyuvantes de tipo ISCOMs en la formulación de vacunas basadas en células enteras o lisadas de microorganismos (Sun y col., 2009). En el Capítulo II de este trabajo de tesis se demostró la capacidad de Iscom Matrix™ de desarrollar potentes respuestas humorales con producción de citoquinas en vaquillonas preñadas, al ser utilizado en la formulación de una bacterina CP5 de *S. aureus*, comparado con una bacterina formulada con un adyuvante clásico. En esta parte del trabajo, se compararon las respuestas inmunes generadas por la bacterina previamente ensayada y por un lisado de células de *S. aureus*, formulados con Iscom Matrix™, al ser administrados en bovinos.

Trabajos previos reportaron la capacidad de preparaciones obtenidas por lisis de células de *S. aureus* adyuvadas con diferentes compuestos para inducir la producción de anticuerpos contra los antígenos vacunales (O' Brien y col., 2001; Luby 2007). En este estudio, la aplicación de 2 dosis pre-parto en vaquillonas preñadas de ambos inmunógenos formulados con Iscom Matrix™, estimuló la generación de anticuerpos específicos en sangre, de tipo IgG e IgG<sub>2</sub>. Concordando con los resultados obtenidos en el ensayo anterior, el esquema de inmunización aplicado, generó un nivel máximo de anticuerpos hacia la primera semana post-parto (aproximadamente 20 días luego de la segunda inoculación), lo cual podría traducirse en un potencial beneficio para la protección de los animales en el período con mayor susceptibilidad a mastitis. Entre ambos inmunógenos evaluados, el preparado sobre la base de células lisadas de *S. aureus* estimuló una mayor producción de anticuerpos dirigidos hacia sus componentes vacunales. Al igual que en un estudio realizado en terneras, donde los anticuerpos producidos por la inmunización con Lysigin™ fueron capaces de reconocer células enteras de *S. aureus* (Nickerson y col., 1999), los anticuerpos de los animales inmunizados con *S. aureus* lisado tuvieron reconocimiento hacia la bacteria entera en los ensayos de ELISA. Incluso, aunque la diferencia no haya sido estadísticamente significativa, se observó una tendencia hacia una mayor detección de IgG e IgG<sub>2</sub> anti- bacterina en los animales inmunizados con lisado de *S. aureus*. Esta superioridad en la respuesta inmune humoral podría explicarse por una mayor capacidad de interacción entre los múltiples componentes generados a partir de la ruptura de las células del microorganismo y la partícula de adyuvante. Las nanoesferas de Iscom Matrix™ poseen carga negativa, lo que les permite unir antígenos con carga positiva, conduciendo a la formación de complejos con mayor eficiencia de exposición y *delivery* (Pearse y Drane, 2005).

Para evaluar la presencia de células de memoria, llegando al final del período de primera lactancia de los animales y antes del inicio de la etapa de involución mamaria determinada por

el fin de la lactancia, se aplicó una tercera dosis de vacuna luego de aproximadamente 8 meses de comenzado el ensayo de inmunización. La misma, indujo una respuesta de IgG específica en ambos grupos vacunados, que alcanzó, en solo 15 días, más del 70% de los niveles observados luego de la aplicación de las 2 dosis iniciales. En un estudio previo realizado en vaquillonas, donde se compararon las respuestas inmunes generadas por células inactivadas de *S. aureus* CP5 o CP5 conjugado, la aplicación de una tercera dosis de los inmunógenos a los 11 meses de la segunda aplicación, generó una respuesta de anticuerpos secundaria que alcanzó en 21 días niveles similares a los observados durante la respuesta primaria (Tollersrud y col., 2001). Estas observaciones permiten sugerir que un esquema de inmunización basado en la aplicación de 2 dosis iniciales de vacuna, y un refuerzo anual previamente a la finalización de la lactancia, induciría respuestas inmunes significativas, que serían beneficiosas para el control de aparición de IIM por *S. aureus* en la involución temprana de la glándula mamaria, ya que en esta etapa se incrementa la susceptibilidad a las IIM (Oliver y Sordillo, 1989).

Durante décadas se han realizado numerosos intentos de estimular la producción de anticuerpos opsonizantes en la glándula mamaria bovina, utilizando diferentes adyuvantes (O'Brien y col., 2001; Pereira y col., 2011) y vías de inoculación (Brock y col., 1975; Guidry y col., 1980; Nonnecke y col., 1986; Barrio y col., 2003). En este trabajo, coincidiendo con los resultados presentados previamente, la inmunización con *S. aureus* inactivado o lisado, formulado con Iscom Matrix™, indujo la producción de IgG específica en leche que superó significativamente a la observada en los animales control. Sin embargo, no se detectaron niveles elevados de IgG<sub>2</sub> en esta secreción, para ninguna de las formulaciones evaluadas. Estos resultados concuerdan también, en parte, con los reportados por Luby y col. (2007); si bien la administración de una vacuna comercial conteniendo un lisado de cepas de *S. aureus* CP5, CP8 y 336, incrementó los niveles de IgG en leche hacia las cepas CP8 y 336, no se observó IgG anti-*S. aureus* CP5, ni IgG<sub>2</sub> específica para ninguna de las cepas estudiadas. La leche de glándulas mamarias sanas contiene bajos niveles de IgG<sub>2</sub> (Caffin y Poutrel, 1988). Si bien la ausencia de IgG<sub>2</sub> en leche en el presente estudio sugiere una capacidad opsonica reducida, la IgG<sub>2</sub> se incrementa significativamente en leche durante la inflamación de la glándula mamaria (Sordillo y Streicher, 2002). Sin embargo un potencial pasaje de esta subclase a leche debería ser evaluado luego de un desafío experimental.

Considerando que los métodos de inactivación o lisis de células de *S. aureus* pueden afectar la conformación de los determinantes antigénicos del microorganismo, se evaluó la producción de anticuerpos dirigidos hacia componentes de *S. aureus* implicados en la interacción temprana entre el microorganismo y las células del huésped (Kerro Deigo y col., 2002; Foster,

2005; Fournier y col., 2008), al utilizar como inmunógeno células enteras formalinizadas o lisadas del mismo. Por otro lado, los inmunógenos disponibles comercialmente no incluyen proteínas extra-celulares, como son las toxinas de *S. aureus*, ya que son liberadas al medio durante el cultivo del microorganismo y eliminadas en los lavados de las células realizados durante la preparación de las formulaciones. Sin embargo, se ha demostrado, que la ruptura de células de *S. aureus* produce la liberación de proteínas del citoplasma al medio de cultivo (Jones y col., 2008). Frente a esto, se deseó determinar si la lisis enzimática de las células del microorganismo produciría la liberación de las toxinas preformadas en el citoplasma para su posterior secreción. Utilizando CP5 purificado, y los antígenos recombinantes  $\beta$ -toxina, FnBP-A y ClfA, se evaluó por ELISA la presencia de anticuerpos específicos para cada una de estas moléculas, en los sueros de los animales incluidos en el ensayo de inmunización. Ambos grupos vacunados desarrollaron una respuesta de IgG específica para CP5 en sangre significativamente superior a la detectada en los animales control, concordando con estudios previos en donde, la inmunización con un lisado de una cepa CP2 de *S. aureus* incorporado en microesferas, indujo respuestas específicas para CP2 que se mantuvieron por, al menos, 16 semanas (O' Brien y col 2001). Sin embargo, no se encontraron niveles detectables de anticuerpos dirigidos hacia los demás antígenos evaluados. Los inmunógenos utilizados en este estudio han sido preparados a partir de células de cultivos en fase estacionaria, en condiciones favorables para aumentar la expresión de polisacáridos capsulares. La ausencia de anticuerpos hacia las moléculas FnBP-A y ClfA, podría deberse a que la máxima expresión de las mismas, así como de gran parte de las proteínas de superficie de *S. aureus*, se observó *in vitro* en la fase de crecimiento exponencial del microorganismo (Lowy, 1998). Además, se ha demostrado que la misma está influenciada *in vivo* por características intrínsecas de la cepa, así como por el microambiente y sitio de infección (Nanra y col., 2009), e *in vitro*, por las condiciones de cultivo, como ser la presencia de citoquinas en el medio (Kanangat y col., 2007). Por otra parte, Risley y col. (2007) demostraron que la expresión de CP en cepas de *S. aureus* CP5 o CP8, enmascararía las adhesinas de superficie, ya que inhibe la unión mediada por ClfA de la bacteria a fibrinógeno y plaquetas. En cuanto a la ausencia de anticuerpos hacia la  $\beta$ -toxina, los resultados de la presente experiencia sugieren que la lisis de células de *S. aureus* no sería suficiente para la liberación de la pre-proteína y su exposición al sistema inmune del huésped.

Uno de los principales mecanismos de virulencia de *S. aureus* radica en su habilidad de evadir la fagocitosis por neutrófilos a través de la producción de polisacáridos capsulares, y en adherirse y penetrar en los tejidos del huésped (Kerro Deigo y col, 2002). En esta parte del trabajo, si bien la inmunización de vaquillonas con ambos inmunógenos experimentales, indujo

una fuerte respuesta de anticuerpos específicos, se evaluó la funcionalidad de los mismos en cuanto a su habilidad de reconocer a *S. aureus* e inhibir sus mecanismos patogénicos. Para esto, los sueros obtenidos a los 7 días post-parto de los animales involucrados en el estudio se utilizaron para la opsonización de *S. aureus* en ensayos de fagocitosis *in vitro*. Los anticuerpos generados en ambos grupos inmunizados favorecieron la fagocitosis de *S. aureus* por un mayor número de neutrófilos, con un número superior de bacterias internalizadas por cada neutrófilo positivo respecto del grupo control. Además, no se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos entre los sueros de ambos grupos inmunizados. Estos resultados concuerdan con la similitud en los niveles de IgG anti-CP5 desarrollados por las formulaciones, ya que se ha propuesto que el favorecimiento de la actividad fagocítica de los PMN sería mediado por los anticuerpos dirigidos hacia los CPs de *S. aureus* (Guidry y col., 1991; Guidry y col., 1994).

Se estudió también la capacidad de las defensas humorales generadas por la vacunación para inhibir la internalización de *S. aureus* en células epiteliales mamarias, MAC-T. La pre-incubación de las bacterias con los sueros obtenidos a los 7 días post-parto de los animales de ambos grupos inmunizados, redujo significativamente los recuentos de ufc en las células epiteliales mamarias, respecto de los sueros control; no hallándose diferencia entre los resultados observados entre ellos. Si bien el mecanismo de internalización de *S. aureus* en las células del huésped más estudiado ha sido el mediado por la FnBP del microorganismo (Fowler y col., 2000), diferentes estudios han mostrado la implicancia de otras moléculas en la invasión celular, como la proteína de adherencia extracelular (Eap) (Sinha y Fraunholz, 2010), proteína de unión a colágeno (Foster y Höök, 1998) o los ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Sinha y Herrmann, 2005). Esto podría explicar la capacidad de los sueros de los animales inmunizados en este estudio de inhibir la adherencia e internalización de *S. aureus* a células MAC-T, a pesar de que los mismos no incluyan anticuerpos hacia la rFnBPA. Cifrian y col. (1996b), demostraron la capacidad de anticuerpos dirigidos hacia la cepa M60 de *S. aureus* de disminuir la adherencia del microorganismo a cultivos primarios de células epiteliales mamarias. Posteriormente, en un estudio realizado por O' Brien y col., (2001), los anticuerpos generados por la inmunización de bovinos con un lisado de una cepa CP2 incorporada en microesferas, redujo significativamente el número de bacterias adheridas a células MAC-T, en comparación con los sueros pre-inmunes. Por otra parte, la inmunización de vacas en lactancia con un plásmido conteniendo la secuencia codificante para ClfA, seguido de un *booster* con el antígeno recombinante, estimuló la producción de anticuerpos en sangre y leche, que redujeron la adherencia del patógeno a células MAC-T, en comparación con los sueros generados por la inmunización con el plásmido

vacío (Nour El-Din y col., 2006). La posibilidad de contar con inmunógenos capaces de generar anticuerpos que logren disminuir la internalización de *S. aureus* en los tejidos mamarios resultaría beneficiosa en la reducción del establecimiento de IIM dando también una oportunidad adicional a los neutrófilos presentes en la glándula mamaria de fagocitar al microorganismo.

Los perfiles de respuesta innata inducidos por los inmunógenos compuestos por células de *S. aureus* lisadas o inactivadas formuladas con Iscom Matrix™, se evaluaron mediante el análisis de la expresión relativa de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , en células mononucleares de sangre periférica a las 24 horas de aplicación de la segunda dosis de vacuna. Ambas formulaciones ensayadas regularon positivamente la expresión relativa de IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente en este trabajo de tesis en donde, la administración de una bacterina CP5 de *S. aureus* formulada con Iscom Matrix™ estimuló una mayor producción de IL-10 e IL-12, en relación al inmunógeno formulado con Al(OH)<sub>3</sub> (Capítulo II). Sin embargo, en dicho estudio, solo se observó una regulación positiva de TNF- $\alpha$  en 2 de los 6 animales inmunizados con *S. aureus* en Iscom Matrix™. No obstante, una tendencia hacia una regulación positiva de la citoquina regulatoria IL-10, y de la pro-inflamatoria IL-12, se mantiene para todas las formulaciones con Iscom Matrix™ ensayadas a lo largo de este trabajo de tesis. Se ha demostrado que tanto IL-10 como TNF- $\alpha$ , no incrementan sus niveles en bovinos frente a la infección temprana por *S. aureus*, por lo que la obtención de inmunógenos capaces de regular positivamente la expresión de estas citoquinas sería de potencial importancia en el control de dichas infecciones por el microorganismo. Estos resultados concuerdan además con los numerosos estudios previos, revisados por diferentes autores, donde se destaca la capacidad de los complejos inmunoestimulantes de tipo ISCOMs de generar respuestas celulares/humorales balanceadas (Sjölander y col., 1998; Pearse y Drane, 2004). Sin embargo, la producción temprana de las citoquinas IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ , se encontró más marcada luego de la inmunización con la formulación conteniendo células lisadas de *S. aureus*.

Como conclusión, la inmunización de vaquillonas preñadas con dos inmunógenos compuestos por células enteras o lisadas de *S. aureus*, formulados con Iscom Matrix™ generó potentes respuestas humorales en sangre y leche, con anticuerpos capaces de favorecer la fagocitosis del microorganismo por PMN bovinos e inhibir su internalización en células epiteliales mamarias. La formulación con lisado bacteriano mostró un mejor desempeño en cuanto a la producción de anticuerpos específicos y regulación de citoquinas regulatorias e inflamatorias con potencial importancia en el control de IIM por *S. aureus*.

## **CAPÍTULO V: ENSAYO III DE INMUNIZACIÓN EN BOVINOS: INCORPORACIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES AL LISADO DE *S. aureus***

### **V.1. MARCO TEÓRICO**

En el capítulo anterior de este trabajo de tesis, se demostró la capacidad de un inmunógeno compuesto por células lisadas de *S. aureus* formuladas con Iscom Matrix™ de generar una potente respuesta inmune humoral en vaquillonas, con producción de anticuerpos específicos capaces de favorecer la fagocitosis del microorganismo por PMN y de inhibir su adherencia e internalización en células epiteliales mamarias. Sin embargo, no se observó la producción de anticuerpos dirigidos hacia componentes antigénicos de *S. aureus*, que se consideran relevantes en la infección por este organismo, en los animales inmunizados con dicha formulación.

En investigaciones previas, el agregado de toxoides estafilocócicos y componentes capsulares y pseudocapsulares a células inactivadas de *S. aureus*, ha sido una estrategia común en el desarrollo de vacunas contra mastitis estafilocócicas. En 1992, Watson mostró que un inmunógeno experimental compuesto por cepas de *S. aureus* crecidas en condiciones favorables para la expresión de pseudocápsula, combinada con toxoides estafilocócicos en aceite mineral y dextrán sulfato, proporcionó protección frente a mastitis clínicas en vaquillonas desafiadas con diferentes cepas de *S. aureus*. Más tarde, Nickerson y col., (1993) confirmaron que la vacuna desarrollada por Watson era, además, efectiva en reducir el número de nuevas IIM desarrolladas luego de desafíos experimentales. Con el advenimiento de la tecnología de ADN recombinante surgieron en los últimos años nuevas estrategias para el desarrollo de inmunógenos, incluyendo componentes individuales de *S. aureus*, que fueron identificados como esenciales por su rol en la patogénesis de la infección por este organismo. En diferentes modelos murinos y bovinos de mastitis estafilocócicas, la inmunización con plásmidos codificantes para antígenos individuales de *S. aureus*, como ClfA y FnBP, o con las moléculas recombinantes, indujeron fuertes respuestas humorales específicas, que aumentaron la opsonofagocitosis por PMN, inhibieron la adherencia a células epiteliales mamarias y confirieron una protección parcial luego de desafíos experimentales (Nelson y col., 1991; Brouillette y col., 2002; Nour El-Din y col., 2006; Gong y col., 2010;). Los resultados de efectividad parcial de los estudios realizados, tanto con bacterinas y lisados de *S. aureus* como con antígenos individuales, han conducido a la propuesta que, para una profilaxis efectiva contra las IIM causadas por *S. aureus*, se debería contar con inmunógenos compuestos por una

multiplicidad de determinantes antigénicos del microorganismo, los cuales actuarían en diferentes etapas de la infección, e incluso tendrían, en algunos casos, influencia sobre la severidad de la enfermedad desarrollada por el huésped (Fournier y col., 2008). Sin embargo existen pocos antecedentes sobre el uso de inmunógenos multicomponentes para el control de IIM causadas por *S. aureus* y, en su mayoría, no han sido evaluados en modelos bovinos.

La inmunización de conejos con una mezcla de CP5 purificado, sobrenadante de cultivo de una cepa productora de  $\alpha$ -toxina, y la molécula recombinante FnBP, indujo la producción de anticuerpos específicos hacia los antígenos vacunales. Luego de un desafío, los animales inmunizados mostraron además menores recuentos de bacterias tanto en sangre como en bazo e hígado, en comparación con animales control (Park y col., 1999). En uno de los primeros estudios realizados en bovinos con vacunas a ADN para mastitis estafilocócicas, se inmunizaron vaquillonas preñadas con dos dosis de un plásmido codificante para fragmentos peptídicos de los antígenos FnBP-A y ClfA, seguidas de un *booster* con los antígenos recombinantes (Shkreta y col., 2004). La inmunización indujo respuestas celulares y humorales con producción de anticuerpos funcionales, y proporcionó una protección parcial luego de un desafío experimental, mediante la reducción de los recuentos de bacterias en leche y alivio de la sintomatología clínica. Más recientemente, Castigluolo y col. (2006) desarrollaron un esquema de inmunización intranasal en ratones con una mezcla de plásmidos codificantes para las proteínas FnBP-A, ClfA, proteína de unión a fibrinógeno (EfB) y proteína de unión a colágeno (Cna). Los animales inmunizados desarrollaron niveles elevados de IgG en sangre y mucosas, que inhibieron la adhesión a células epiteliales mamarias *in vitro*, y mostraron un menor recuento de bacterias en las glándulas mamarias, luego de un desafío experimental. Si bien estos resultados sugieren que los inmunógenos evaluados producen una respuesta inmune que contribuiría a la protección contra la infección por *S. aureus*, deben interpretarse con precaución debido a diferencias entre los diferentes modelos animales utilizados. Por otra parte, *S. aureus* posee una compleja red de factores de regulación que controlan la expresión de los genes de virulencia, permitiéndole adaptarse a cambios del microambiente de la infección (Novick, 2003; Tuscherr y col., 2010). Es por esto, que las preparaciones de bacterinas o lisados del microorganismo obtenidas a un tiempo fijo de cultivo pueden no ser representativas de la totalidad de los determinantes antigénicos expuestos al huésped durante el desarrollo de la IIM. La combinación de células inactivadas de *S. aureus*, con proteínas bacterianas que se expresen durante diferentes estadios de la infección y en diferentes cepas proveerían herramientas útiles en futuros desarrollos de vacunas contra mastitis estafilocócicas (Gaudreau y col., 2007, Middleton, 2008). Como hipótesis, la respuesta

inmune generada por el inmunógeno debería dirigirse contra componentes que cumplan un rol determinante tanto en las primeras etapas de la interacción huésped-patógeno, como en la evasión del sistema inmune, y en etapas más avanzadas de la infección bacteriana y que, en presencia de un adyuvante adecuado, permitiría la generación de una respuesta humoral-celular beneficiosa para el control de la infección.

## V.2. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Sobre la base de los antecedentes anteriormente expuestos y de los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas en los ensayos previos a campo, se propuso obtener un inmunógeno prototípico compuesto por lisado de *S. aureus* CP5 como base de la formulación, suplementado con los antígenos recombinantes  $\beta$ -toxina, FnBP-A y ClfA, y formulado con el adyuvante de nueva generación Iscom Matrix<sup>TM</sup>.

- **Objetivos específicos**

1. Desarrollar un esquema de inmunización de vaquillonas preñadas con un lisado de *S. aureus* CP5, y un lisado del mismo suplementado con antígenos recombinantes, ambos formulados con Iscom Matrix<sup>TM</sup>.

2. Evaluar la respuesta inmune humoral específica inducida por las vacunaciones, hacia *S. aureus* así como hacia factores de virulencia del microorganismo.

3. Determinar la capacidad de los anticuerpos generados de favorecer la fagocitosis de *S. aureus* por PMN y neutralizar la actividad de la  $\beta$ -toxina nativa de *S. aureus*.

4. Evaluar la respuesta inmune celular y de memoria mediante la estimulación de células mononucleares *in vitro*.

5. Evaluar la aparición de IIM por *S. aureus* durante la primera lactancia de los animales incluidos en el estudio, mediante seguimiento bacteriológico.

### **V.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **V.3.1. INMUNIZACIÓN Y MUESTREO**

##### **V.3.1.1. Preparación de lisado de *S. aureus***

Se cultivó *S. aureus* Reynolds en Agar Salado durante toda la noche a 37°C, para favorecer la expresión de cápsula (Fattom y col., 1990). El microorganismo se resuspendió en PBS estéril a concentración  $2.10^9$  ufc/ml. Se agregaron 35 U de lisostafina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incubó durante 6 horas a 37°C en agitación (100 rpm). La reacción se monitoreó midiendo periódicamente Abs. OD<sub>600</sub>. Transcurrida la incubación se inactivó la lisostafina mediante la incubación en baño de agua a 75°C por 15 minutos. Finalmente, se pasó la mezcla por un filtro de 0,45 um para remover las bacterias intactas (O'Brien y col., 2001).

##### **V.3.1.2. Antígenos recombinantes**

Se utilizaron los antígenos recombinantes rBT, rFnBPA y rClfA (Ver Capítulo III). Previamente a la formulación de las vacunas, la actividad hemolítica de la rBT se neutralizó mediante la incubación con formol 1%, durante 24 horas a 4°C (Nickerson y col., 1993). Posteriormente, el antígeno inactivado se incubó con GR de carnero para confirmar la pérdida total de actividad (Ver III.3.3.). Luego, se preparó una mezcla conteniendo a los 3 antígenos recombinantes a una concentración final de 400 µg/ml de cada uno de ellos. La misma se pasó por filtro de 0,2 µm y se sometió a controles de esterilidad mediante la siembra de 100 µl de las mismas en placas de Agar Sangre e incubación por 48 hs a 37°C.

##### **V.3.1.3. Formulación de las vacunas**

Sobre la base de los componentes descritos en los ítems previos, se prepararon 2 inmunógenos experimentales. Uno de ellos consistió en una suspensión de  $1.10^9$  ufc/ml de *S. aureus* lisado y el otro en una mezcla de  $1.10^9$  ufc/ml de *S. aureus* lisado y 200 µg/ml de cada uno de los antígenos rBT, rFnBPA y rClfA. A ambas preparaciones se les agregó 2mg/ml de Iscom Matrix™ y se mezcló por inversión. Una tercera formulación de solución fisiológica y adyuvante se utilizó como placebo. Todas las preparaciones fueron sometidas a controles de esterilidad mediante la siembra de 100 µl de las mismas en placas de Agar Sangre e incubación por 48 horas a 37°C. Las preparaciones se conservaron en heladera hasta su utilización, por no

más de 72 horas.

#### **V.3.1.4. Animales**

Se utilizaron 27 vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación, pertenecientes al rodeo experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA. Los animales se mantuvieron alimentados con pasturas a base de alfalfa suplementada con grano de maíz desde los 60 hasta los 30 días previos al parto. Luego, se alimentaron con TMR basada en silo de maíz hasta el parto. Luego del parto estuvieron bajo condiciones de pastoreo (alfalfa) recibiendo TMR suplementada con silo de maíz. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigaciones Agropecuarias y Enseñanza (FASS, 1999).

#### **V.3.1.5. Inmunización y muestreo**

Se conformaron 3 grupos de 9 vaquillonas Holstein preñadas, los cuales recibieron las siguientes formulaciones:

*Grupo Control:* (1 ml de solución fisiológica + 2 mg Iscom Matrix™)/dosis

*Grupo Lisado:* (1.10<sup>9</sup> ufc de *S. aureus* lisado + 2 mg Iscom Matrix™)/dosis

*Grupo Lisado + Recombinantes:* (1.10<sup>9</sup> ufc de *S. aureus* lisado + 200 µg rBT + 200 µg rFnBPA + 200 µg rClfA + 2 mg Iscom Matrix™)/dosis

Se aplicaron dos inyecciones subcutáneas en el área del ganglio supramamario de acuerdo con descripciones previas (Camussone y col., 2010), 45 y 15 días previos a la fecha estimada de parto. Al momento de la segunda dosis vacunal, las glándulas mamarias de todos los animales incluidos en el experimento se examinaron clínicamente por palpación y se tomaron muestras de secreción pre-parto para determinar la presencia de infecciones intramamarias (IIM) por *S. aureus*. Las muestras fueron recolectadas en forma aséptica siguiendo procedimientos estándar (Oliver y col., 2004) y luego del muestreo los pezones de las vaquillonas se sumergieron en una solución antiséptica conteniendo 0,5% de yodo disponible. Solo se incluyeron en el ensayo a vaquillonas libres de IIM por *S. aureus* y sin signos clínicos de inflamación.

Antes del comienzo del protocolo de inmunización se colectó una muestra de sangre por punción de la vena coccígea, lo cual se repitió cada 15 días hasta el día del parto. Dentro de las 24 horas post-parto se tomaron muestras de sangre y de leche de cada cuarto mamario, lo

cual se repitió a los 7, 15, 21, 30 y 60 días (Tabla 9). Una alícuota de leche de cada cuarto mamario fue utilizada para cultivo bacteriológico. Quinientos µl de leche de cada cuarto mamario de las muestras obtenidas a partir del día 7 post-parto se utilizaron para la preparación de muestras compuestas para determinación de anticuerpos. Estas muestras se centrifugaron por 15 minutos a 10.000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras de sangre se dejaron coagular mediante incubación a temperatura ambiente y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 1.500 rpm por 10 minutos. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. A partir del tercer mes y hasta el final de la lactancia, se realizaron muestreos de leche de forma mensual, para su análisis bacteriológico (Tabla 9). Se controló la aparición de reacciones adversas a los inmunógenos a través de la observación clínica periódica.

Semanas/ Tratamiento	-6	-4	-2	0 (parto)	1	2	4	2 meses	3 meses	//	9 meses
Dosis de vacuna	1 <sup>era</sup>		2 <sup>da</sup>							//	
Muestras de sangre	x	x	x	x	x	x	x	x		//	
Muestras de leche				x	x	x	x	x	x	//	x

**Tabla 9.** Esquema de inmunización y muestreo de sangre y leche de vaquillonas en el ensayo a campo.

### V.3.1.6. Análisis bacteriológico de muestras de leche

Para cada una de las instancias de muestreo, se tomaron 10 µl de las muestras obtenidas de cada cuarto mamario de todos los animales en ensayo y se sembraron en un cuadrante de una placa de Agar Sangre. Las mismas se incubaron 18 horas a 37°C para detectar la presencia de organismos de crecimiento rápido. En caso de no observarse desarrollo, se re-incubaron por otras 24 horas (Oliver y col., 2004). La presencia de una colonia de *S. aureus* en Agar Sangre se consideró como identificación positiva; con lo cual el límite de detección fue de 100 ufc/ml. Las vaquillonas que arrojaron un cultivo positivo en cualquier muestra a lo largo del estudio fueron excluidas del mismo. Se definió como IIM la obtención de 2 cultivos positivos consecutivos (Smith y col., 1990). La caracterización de los microorganismos aislados se realizó mediante observación microscópica y sobre la base de reacciones bioquímicas clásicas (Ver sección II.3.1.6.).

## **V.3.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

### **V.3.2.1. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)**

Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano (GBO) con una suspensión de  $1.10^8$  ufc de *S. aureus* lisado, 5 µg de CP5, 0,5 µg de rBT, 0,5 µg de rFnBPA, o 0,5 µg de rClfA, según correspondiera. Todos los antígenos se resuspendieron en PBS (pH 7,2). Se procedió de acuerdo a la metodología descrita previamente (Ver Sección II.3.3.1.).

Para el análisis comparativo de las respuestas de anticuerpos de los diferentes grupos de tratamiento a través del tiempo, se utilizó un diseño con datos recogidos en una secuencia de puntos espaciados en el tiempo en forma desigual, empleándose un modelo factorial para los factores tratamiento y tiempo. Las medias de DO obtenidas en los test de ELISA para IgG e IgG<sub>2</sub> de los diferentes grupos de tratamiento, fueron comparadas en cada estación de muestreo por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por el test de Mann-Whitney para detectar diferencias entre pares ( $p < 0,05$ ).

### **V.3.2.2. Western Blot (WB)**

Diez µl de cada una de las proteínas rBT y nBT se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE (Ver Sección III.3.1.3.3.) y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (BioRad®), utilizando el sistema de transferencia húmeda Mini Trans-blot Cell (BioRad®). La transferencia se realizó durante una hora a un voltaje constante de 100 V, en buffer de transferencia. Las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos en solución de bloqueo. A continuación, se incubaron con pools de sueros obtenidos a los 7 días post-parto para cada uno de los grupos evaluados, diluidos en PBS suplementado con 1% de leche de cabra descremada. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrida la incubación, se realizaron tres lavados con PBS-Tween y un lavado con PBS para eliminar los anticuerpos no unidos y evitar así reacciones inespecíficas. Posteriormente las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG bovina conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido en PBS suplementado con 1% de leche de cabra descremada, a temperatura ambiente durante 45 minutos. Transcurrido dicho tiempo, las membranas se lavaron nuevamente para eliminar el exceso de anticuerpo conjugado y finalmente, se incubaron en solución de equilibrado de peroxidasa. La reacción colorimétrica se desarrolló en oscuridad hasta que el color alcanzó la intensidad deseada, y se detuvo sumergiéndola en agua destilada.

### **V.3.2.3. Ensayos de fagocitosis para la evaluación de la capacidad opsónica de los anticuerpos**

Se utilizaron los sueros obtenidos al día 7 post-parto de todos los animales incluidos en el estudio. Para la marcación de bacterias, purificación de neutrófilos y ensayo de fagocitosis se procedió de igual manera a la descrita previamente (Ver Sección II.3.3.2.). Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las muestras se conservaron en buffer de citometría suplementado con 1% de formol a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo. Las medias de los porcentajes de neutrófilos positivos, o IFM para cada grupo de tratamiento, fueron comparadas por medio de análisis de la varianza para muestras repetidas (ANOVA), seguido por el test de Duncan en caso de obtener diferencias significativas (Ver Sección II.3.3.2.) ( $p < 0,05$ ).

### **V.3.2.4. Inhibición de actividad hemolítica**

Se obtuvieron 50 ml de sangre de carnero por punción de la vena yugular. Tres ml de sangre se llevaron a 10ml con PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 2.500 rpm para sedimentar los GR. Se extrajo el sobrenadante con pipeta Pasteur y se repitió el lavado 2 veces más, hasta obtener un sobrenadante limpio. Finalmente se tomaron 500  $\mu$ l de GR y se diluyeron en 10 ml de Solución diluyente de GR.

En una placa de 96 pocillos con fondo en U se colocaron 100  $\mu$ l de diluciones seriadas de nBT o rBT (en solución diluyente de GR) y se agregaron 100  $\mu$ l de las diluciones correspondientes de los pools de sueros preparados para cada uno de los grupos a evaluar. Se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión de GR. Se incubó durante 1 hora a 37°C, luego 1 hora a temperatura ambiente, y por último toda la noche a 4°C. Se registraron los títulos obtenidos al final de cada incubación de acuerdo con descripciones previas (Wadström y Möllby, 1971).

## **V.3.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR.**

### **V.3.3.1. Linfoproliferación *in vitro***

#### **V.3.3.1.1. Obtención de los linfocitos bovinos**

Se seleccionaron al azar 3 animales de cada uno de los grupos en estudio. A los 60 días posteriores al parto, se tomaron 10 ml de sangre de vena yugular en jeringas conteniendo 1 ml de EDTA 1%. En flujo laminar, las muestras obtenidas se pasaron a tubos plásticos de 50 ml

estériles, y se diluyeron al medio con PBS. Nueve ml de sangre diluida se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml conteniendo 3 ml de Histopaque 1083 (Sigma), y se centrifugó durante 20 minutos a 1.400 rpm a temperatura ambiente. Con pipeta Pasteur de vidrio se recogió la capa de células mononucleares contenida en la interfase, y se transfirió a tubos limpios conteniendo 5 ml de PBS. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra, reuniendo las células obtenidas para cada una en un mismo tubo. Se centrifugó durante 10 minutos a 1.400 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Este lavado se repitió nuevamente y posteriormente las células se resuspendieron en 1 ml de PBS para recuento y determinación de la viabilidad celular (Ver sección II.3.3.2.3.). Luego se centrifugó durante 10 minutos a 1.400 rpm a temperatura ambiente y el pellet celular se resuspendió en 900  $\mu$ l de SFB y se transfirió a crioviales estériles. Los tubos se colocaron en baño de hielo y luego se agregaron, gota a gota, 100  $\mu$ l de DMSO (Merck). Se mezcló por inversión y se llevó a -20°C durante 3-4 horas. Posteriormente, los tubos se incubaron durante la noche a -86°C y finalmente se pasaron a tanques con N<sub>2</sub> líquido para su conservación hasta su uso.

#### **V.3.3.1.2. Estimulación *in vitro***

Las células se descongelaron mediante incubación en baño de agua a 37°C. Posteriormente, las mismas se transfirieron a tubos plásticos de 15 ml estériles que contenían 5 ml de RPMI 1640 (Sigma). Se centrifugó durante 10 minutos a 1.400 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640 para la determinación del recuento y la viabilidad celular. Las suspensiones se llevaron a concentración final 4.10<sup>6</sup> cél/ml en medio RPMI completo.

Se sembraron 2.10<sup>5</sup> células/pocillo en placas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Axygen), las cuales se incubaron durante 96 horas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de los estímulos específicos correspondientes (Tabla 10), en 100  $\mu$ l de volumen final. Células incubadas con 0,5  $\mu$ g de Concanavalina A (Sigma) actuaron como control positivo, mientras que células incubadas solamente con medio de cultivo se utilizaron como controles de proliferación basal. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La proliferación celular se determinó mediante inmuno-ensayo colorimétrico, basado en la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN, según instrucciones del fabricante (Cell Proliferation ELISA SYSTEM, Pharmacia Biotrak, Piscataway, NJ). Brevemente, 10  $\mu$ l de solución 100  $\mu$ M de BrdU se agregaron a cada pocillo al tercer día de cultivo. Dieciocho horas después, las placas se centrifugaron y las células se desnaturalizaron por calor e incubaron por 120 minutos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU conjugado a peroxidasa. El exceso

de anticuerpo conjugado se eliminó mediante lavados y posteriormente se agregó la solución de substrato cromogénico. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se frenó la reacción mediante el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M. Finalmente se midió DO a 450 nm en lector de microplacas (Infinite® F50, Tecan). La proliferación celular se calculó como:

$$IE = (E-B)/B$$

Siendo,

IE: Índice de Estimulación

E: DO células estimuladas

B: DO células basales (no estimuladas)

Grupo	Estímulo específico
Control	1.10 <sup>7</sup> ufc <i>S. aureus</i> lisado
Lisado	1.10 <sup>7</sup> ufc <i>S. aureus</i> lisado
Lisado + Recombinantes	1.10 <sup>7</sup> ufc <i>S. aureus</i> lisado + 1,6 µg rBT + 1,6 µg rClfA + 1,6 µg rFnBP-A

**Tabla 10.** estímulos específicos utilizados en los ensayos de proliferación *in vitro* de células MN aisladas de vaquillonas preñadas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™, o control.

#### V.3.4. DIAGNÓSTICO DE IIM. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE *S. aureus* AISLADAS DE IIM EN LOS ANIMALES EN ESTUDIO

##### V.3.4.1. Caracterización molecular

Los microorganismos aislados por cultivo bacteriológico de leche de los animales en estudio, e identificados como *S. aureus* por reacciones bioquímicas clásicas, se caracterizaron por metodologías moleculares. Se obtuvo el ADN genómico de los microorganismos aislados utilizando el kit comercial Genomics DNA Extraction Kit (Real Biotech Corporation), según la metodología descrita previamente (III.3.1.1.2.).

#### V.3.4.1.1. Confirmación de especie mediante Multiplex PCR

Se confirmó la especie *S. aureus* mediante reacciones de Multiplex PCR, según la metodología descrita por Martineau y col. (1998). Las reacciones de PCR se realizaron en presencia de 2 pares de oligonucleótidos (Tabla 11); un par específico para *S. aureus* (Sa442), cuyas secuencias derivan de regiones conservadas del gen codificante para el ARNr 16S, y un par de oligonucleótidos universales que actúan como control interno.

	Sentido	Secuencia (5'→3')	Producto de amplificación (pb)
<b>Universales</b>	Sentido	GGAGGAAGGTGGGGATGACG	241
	Antisentido	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG	
<b>Sa442</b>	Sentido	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	108
	Antisentido	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATAACA	

**Tabla 11.** Oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de Multiplex-PCR para la identificación de *S. aureus*.

Cada determinación se realizó por duplicado, en un volumen final de 20 µl conteniendo la siguiente mezcla de reactivos: 2 µl de Buffer termofílico 10X (Fermentas), 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP (Productos Bio-Lógicos), 0,3 µM de cada uno de los oligonucleótidos Sa442 sentido y antisentido (Productos Bio-Lógicos), 0,08 µM de cada uno de los oligonucleótidos universales sentido y antisentido (Productos Bio-Lógicos), 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas) y 50 ng de ADN genómico. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), utilizando el siguiente programa de ciclado: una desnaturalización inicial de 3 minutos a 96°C, seguida de 30 ciclos de 1 segundo a 95°C y 30 segundos a 55°C.

#### V.3.4.1.2. Evaluación de la presencia de genes codificantes para factores de virulencia de *S. aureus*

Se evaluó la presencia de los genes codificantes para las proteínas ClfA y FnBP-A, así como para los polisacáridos capsulares 5 y 8. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 12:

	Sentido	Secuencia (5'→3')	Temp. de hibridación (°C)	Referencia
<b>CP5</b>	Sentido	GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG	55	Verdier y col, 2007
	Antisentido	ACTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG		
<b>CP8</b>	Sentido	GCCTTATGTTAGGTGATAAACC	55	Verdier y col, 2007
	Antisentido	GGAAAAAACTATCATAGCAGG		
<b>CifA</b>	Sentido	GGCGTGGCTTCAGTGCTTG	51	AJ_629121
	Antisentido	ATTCACCAGGCTCATCAG		
<b>FnBPA</b>	Sentido	GGTGGCCAAAATAGCGGTA	51	Z_18852
	Antisentido	TTGGTGGCACGATTGGAG		

**Tabla 12.** Oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de PCR para la identificación de la presencia de factores de virulencia de *S. aureus*.

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado, en un volumen final de 20 µl conteniendo la siguiente mezcla de reactivos: 2 µl de Buffer termofílico 10X (Fermentas), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP (Productos Bio-Lógicos), 0,3 µM de cada oligonucleótido sentido y antisentido (Productos Bio-Lógicos), 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas) y 50 ng de ADN genómico. Se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer), con el siguiente programa de ciclado: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la Temp. de hibridación adecuada para cada par de oligonucleótidos y 1 minuto a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

#### **V.3.4.2. Caracterización fenotípica. Análisis de la expresión *in vitro* de hemolisinas**

Se evaluó la producción de las hemolisinas α, β y δ de *S. aureus* en placas con Agar Base suplementado con glóbulos rojos de carnero, en presencia de los microorganismos *Corynebacterium pseudotuberculosis* NCTC 3450 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956, de acuerdo con descripciones previas (Calvinho y Dodd, 1994) (Ver III.3.1.1.1.).

## **V.4. RESULTADOS**

De los 27 animales incluidos inicialmente en el estudio, 1 animal del grupo control fue descartado debido a la presencia de IIM por *S. aureus* al pre-parto, y 1 animal del grupo control y otro del grupo lisado fueron excluidos por causa de abortos. Las 24 vaquillonas restantes parieron en promedio 41 días después de la primera dosis de vacuna y 12 días después de la segunda dosis. Un animal del grupo lisado + recombinantes murió a los 50 días post-parto.

No se observaron reacciones adversas a la inmunización en ninguno de los animales incluidos en el ensayo. Solo se observó una mínima dureza (<2.5 cm) en 1 animal del grupo inmunizado con lisado y 1 animal del grupo lisado + recombinantes, luego de 72-96 hs de realizadas las inoculaciones.

### **V.4.1. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN SANGRE**

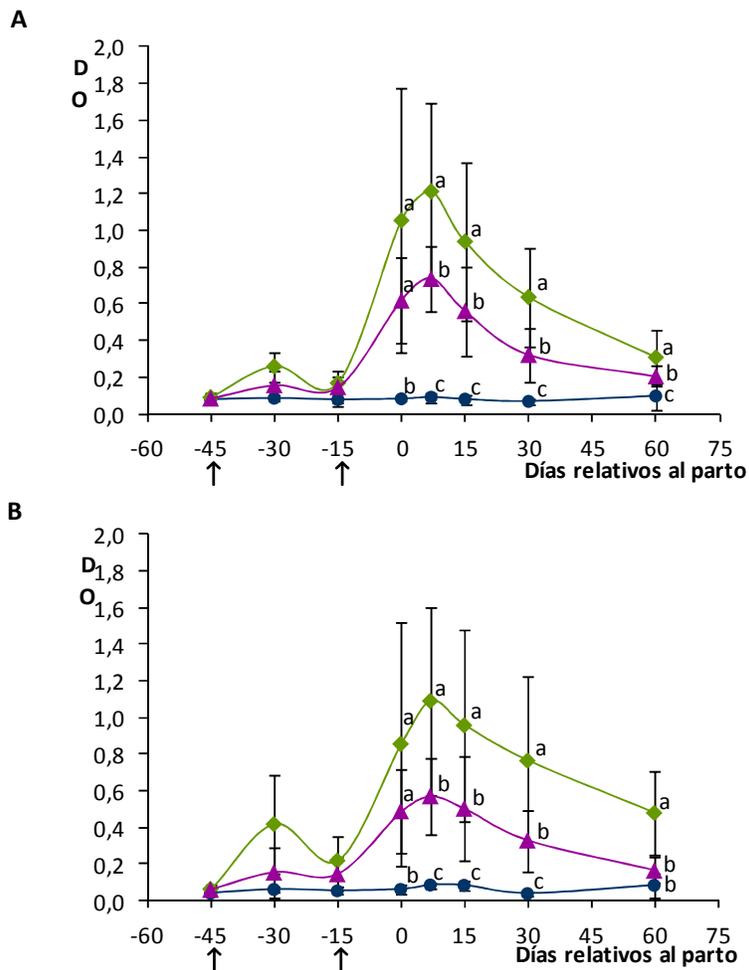
#### **V.4.1.1. Respuesta de anticuerpos anti-lisado de *S. aureus***

Se evaluaron los niveles de IgG e IgG<sub>2</sub> específicas para lisado de *S. aureus*. No se detectaron anticuerpos anti-lisado en los sueros obtenidos previamente a la inmunización de las vaquillonas (Figura 28).

Ambos grupos vacunados presentaron niveles de IgG anti-lisado en sangre significativamente superiores a los del grupo control, luego de la segunda inoculación y hasta el final del período de observación ( $p < 0,05$ ). Entre los animales inmunizados, aquellos que recibieron la formulación con lisado de *S. aureus* fueron los que desarrollaron los mayores niveles de IgG anti-lisado, manteniéndose esta diferencia durante las 8 semanas post-parto que se prolongó el período de observación ( $p < 0,05$ ). La máxima producción de anticuerpos se detectó en la semana posterior al parto, con valores de IgG para los grupos lisado y lisado + recombinantes que superaron por 13 y 8 veces a los detectados en los animales control, respectivamente. (Figura 28.A).

Con respecto a la evaluación de IgG<sub>2</sub> anti-lisado en sangre, luego de la aplicación de 2 dosis de los inmunógenos, ambos grupos inmunizados incrementaron los niveles de forma significativamente superior a los del grupo control ( $p < 0,05$ ). Estos se mantuvieron durante 4 semanas post-parto para el grupo lisado + recombinantes y hasta el final del estudio para el grupo lisado (8 semanas post-parto). Luego de la primera semana post-parto y por las 7

semanas siguientes, los niveles de IgG<sub>2</sub> anti-lisado en los animales inmunizados con lisado bacteriano resultaron además, significativamente mayores a los del grupo inmunizado con lisado + recombinantes ( $p < 0,05$ ). Los valores máximos de anticuerpos para las vaquillonas del grupo lisado, obtenidos el día 7 post-parto, duplicaron a los presentes en los animales vacunados con la formulación multicomponente, y superaron por 20 veces a los detectados en los sueros control. (Figura 28.B).

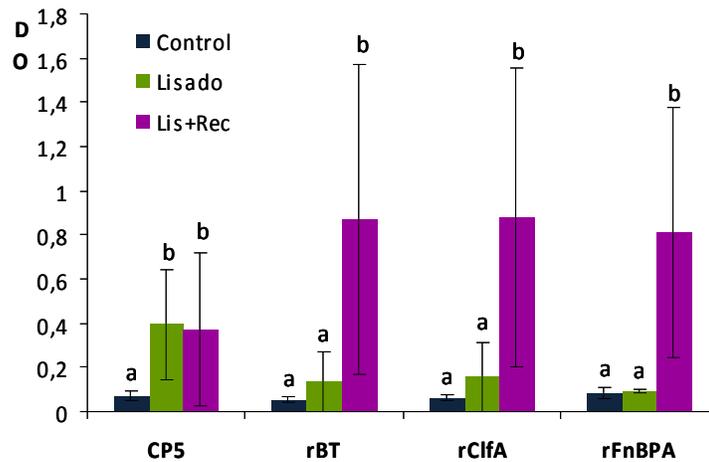


**Figura 28.** Niveles de IgG (A) e IgG<sub>2</sub> (B) anti-lisado en sangre de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (◆), *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™ (▲) o control (●). Las flechas indican los momentos de las inmunizaciones. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### V.4.1.2. Respuesta de anticuerpos específicos para determinantes antigénicos de *S. aureus*.

Se evaluó además la capacidad de las formulaciones de inducir anticuerpos específicos hacia componentes antigénicos de *S. aureus*. Para esto, se midieron los niveles de IgG específica hacia los antígenos CP5, rBT, rClfA y rFnBPA en los sueros obtenidos en la primera semana post-parto de todos los animales incluidos en el estudio.

Ambos grupos inmunizados presentaron niveles de IgG anti-CP5 en las muestras de sangre tomadas a los 7 días post-parto, superiores a los obtenidos para el grupo control ( $p < 0,05$ ); no observándose diferencias significativas entre ellos. Sólo en las muestras de los animales inmunizados con la formulación multicomponente se detectó la producción de anticuerpos específicos anti-rBT, rClfA y rFnBPA ( $p < 0,05$ ) (Figura 29).



**Figura 29.** Niveles de IgG específica anti-CP5, rBT, rClfA y rFnBPA de *S. aureus* en muestras de sangre tomadas a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™, o control. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### V.4.2. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN LECHE

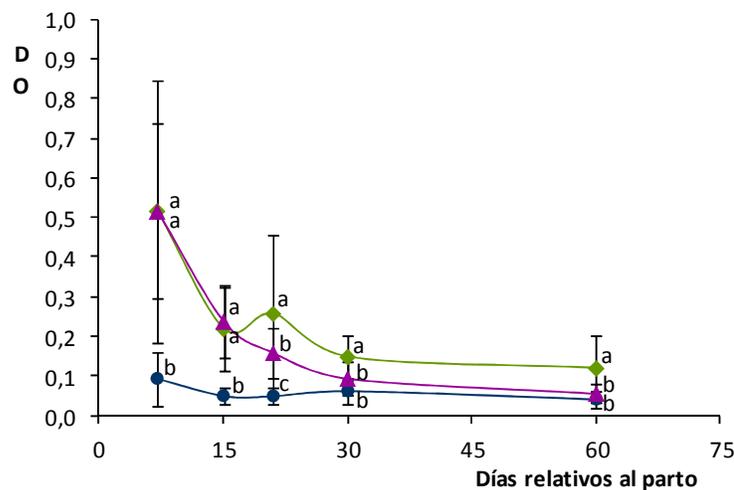
##### V.4.2.1. Respuesta de anticuerpos anti-lisado de *S. aureus*

Se determinaron los niveles de IgG e IgG<sub>2</sub> anti- lisado de *S. aureus* en las muestras de leche de todos los animales incluidos en el estudio.

Ambos grupos inmunizados comenzaron su primera semana de lactancia con niveles de IgG

anti-lisado de *S. aureus* superiores a los presentes en el grupo control ( $p < 0,05$ ). Los mismos se mantuvieron elevados por 3 semanas para el grupo inmunizado con la formulación multicomponente y hasta el final de período de observación para el grupo lisado (8 semanas post-parto) ( $p < 0,05$ ). Desde la tercera hasta la octava semana post-parto, los niveles de IgG anti-lisado en leche de los animales inmunizados con *S. aureus* lisado se mantuvieron significativamente elevados respecto de los detectados en los animales inmunizados con lisado y antígenos recombinantes ( $p < 0,05$ ) (Figura 30).

No se detectó IgG<sub>2</sub> anti- lisado de *S. aureus* en esta secreción, en ninguno de los 3 grupos evaluados.

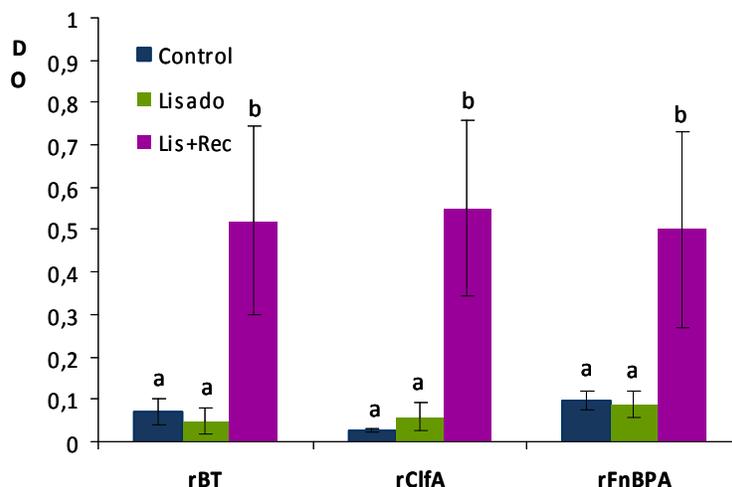


**Figura 30.** Niveles de IgG anti-lisado en suero de leche de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™ (◆), *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™ (▲) o control (●). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### V.4.2.2. Respuesta de anticuerpos específicos para determinantes antigénicos de *S. aureus*.

También en suero de leche se evaluó la capacidad de las formulaciones de generar IgG específica hacia los distintos factores de virulencia de *S. aureus*. Las determinaciones se realizaron con las muestras obtenidas en la primera semana post-parto (Figura 31).

Sólo las muestras de los animales inmunizados con la formulación multicomponente presentaron niveles significativamente elevados de IgG anti - rBT, rClfA y rFnBPA, respecto de los obtenidos para los animales control ( $p < 0,05$ ) (Figura 31). No se detectó IgG específica para CP5 en ninguna de las muestras de leche evaluadas.



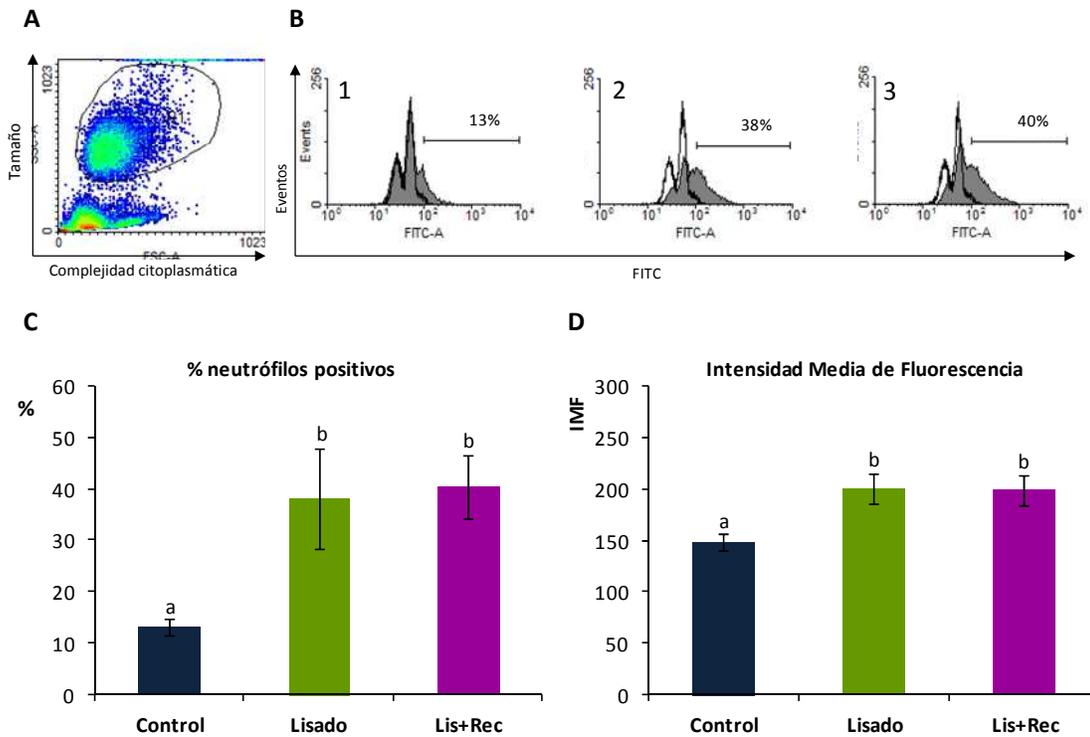
**Figura 31.** Niveles de IgG específica anti- rBT, rClfA y rFnBP de *S. aureus* en leche obtenida a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™, o control. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### V.4.3. OPSONIZACIÓN Y FAGOCITOSIS POR NEUTRÓFILOS BOVINOS

Se evaluó mediante ensayos *in vitro*, la capacidad de los anticuerpos generados por la vacunación de opsonizar a *S. aureus* Reynolds y favorecer su fagocitosis por PMN bovinos. Las determinaciones se realizaron con los sueros obtenidos a los 7 días post-parto de todos los animales incluidos en el estudio. Mediante análisis por citometría de flujo se adquirieron 50.000 eventos y sobre la base de los parámetros de tamaño y complejidad citoplasmática se seleccionó la población R1 conteniendo a los PMN (Figura 32.A). Sobre la misma, se analizó luego la incorporación de *S. aureus* FITC (Figura 32.B).

La Figura 32 muestra las medias del porcentaje de PMN FITC+ (C) e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) (D), para cada grupo evaluado. Los sueros generados por la vacunación tanto con *S. aureus* lisado como con la mezcla de lisado y antígenos recombinantes aumentaron aproximadamente 3 veces el porcentaje de neutrófilos con bacterias fagocitadas ( $38,1\% \pm 9,7\%$  y  $40,3\% \pm 6,2\%$ , respectivamente), comparado con los sueros de los animales control ( $13,1\% \pm 1,8\%$ ) ( $p < 0.05$ ). El número de bacterias ingeridas por PMN positivo, estimado mediante el parámetro IMF, también resultó significativamente mayor cuando los sueros de los animales de los grupos lisado o lisado + recombinantes se utilizaron en los experimentos de

fagocitosis ( $200 \pm 15$  y  $199 \pm 14$ , respectivamente), que al utilizar los sueros de los animales control ( $148 \pm 8$ ) ( $p < 0,05$ ).



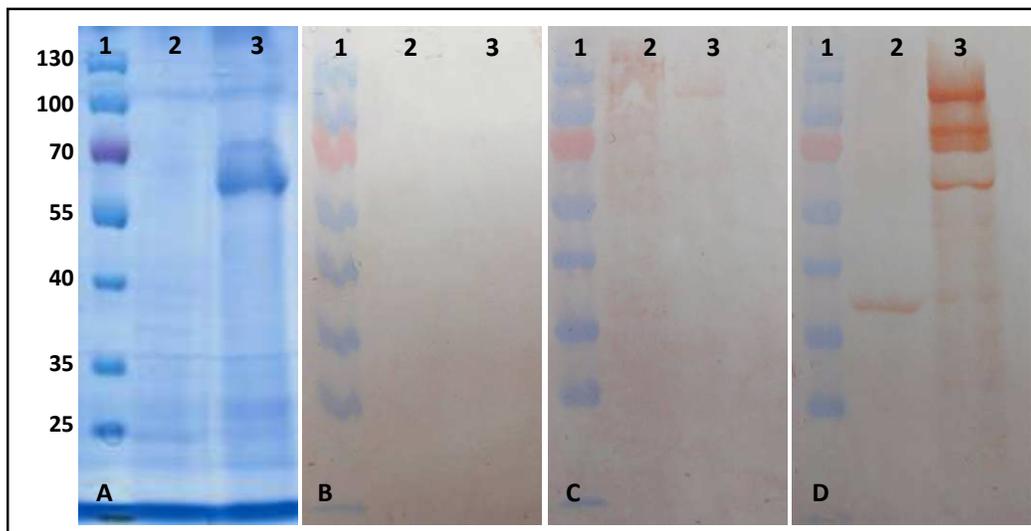
**Figura 32.** Fagocitosis por neutrófilos de *S. aureus* Reynolds opsonizado con sueros obtenidos a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix<sup>TM</sup>, *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix<sup>TM</sup> o control. **A)** población de PMN seleccionada sobre la base de tamaño Vs complejidad citoplasmática. **B)** Histogramas representativos mostrando la intensidad de fluorescencia para PMN control incubados con medio de cultivo (vacío) o PMN incubados con los sueros de animales inmunizados con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix<sup>TM</sup> (2), *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix<sup>TM</sup> (3) o control (1) (gris). (C) La fagocitosis por PMN se expresó como porcentaje de células positivas (C) y como IMF (D). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### V.4.4. RECONOCIMIENTO Y NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE $\beta$ -TOXINA NATIVA DE *S. aureus*

##### V.4.4.1. Western Blot

Se diseñó un ensayo de Western Blot para evaluar la capacidad de los anticuerpos generados por la inmunización con  $\beta$ -toxina recombinante de reconocer al antígeno nativo purificado a partir de sobrenadante de cultivo. Para ello, se corrió en gel de poliacrilamida una muestra de nBT seguido por una de rBT, por cuatuplicado. Una de las fracciones se tiñó con

Azul de Coomasie (Figura 33.A) y las 3 restantes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, sobre las cuales se realizó la determinación (Figura 33.B-D). No se observaron bandas de reconocimiento hacia ninguno de los antígenos evaluados en las membranas incubadas con los pools de sueros de animales inmunizados con *S. aureus* lisado o control. Los sueros del grupo de animales que recibieron la formulación multicomponente reconocieron, en la calle donde se sembró la rBT, una banda de aproximadamente 60 kDa correspondiente con el PM del antígeno recombinante, así como otras bandas de PM mayores. Además, en la calle donde se sembró la nBT, presentaron reconocimiento hacia una banda de aproximadamente 35 kDa, correspondiente con el PM la  $\beta$ -toxina purificada de sobrenadante de cultivo de *S. aureus*.



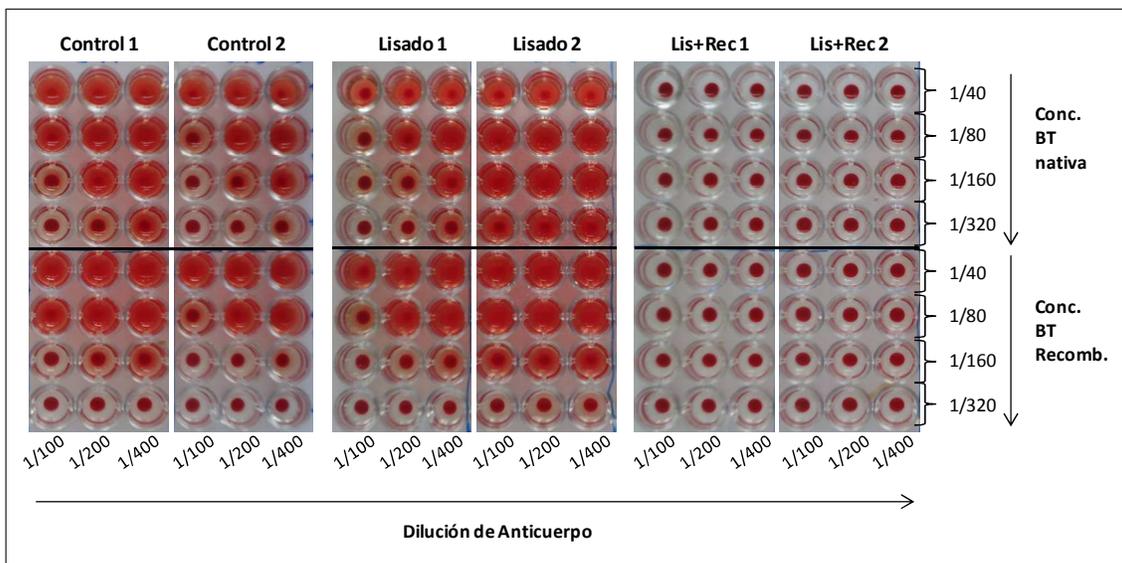
**Figura 33.** A) Gel de Poliacrilamida. Líneas: 1) Marcador de Peso Molecular; 2) nBT; 3) rBT. B-D) Western Blot. Reconocimiento hacia la nBT o rBT por pools de sueros de sangre obtenidos a los 7 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™; (C) o con *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™ (D) control (B).

#### V.4.4.2. Ensayos de Inhibición de la Actividad hemolítica

Para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos generados de inhibir la actividad hemolítica de la  $\beta$ -toxina nativa purificada de sobrenadante de cultivo de *S. aureus*, se diseñaron ensayos de inhibición con glóbulos rojos de carnero. Se prepararon 2 pools de los sueros obtenidos al día 7 post-parto, para cada grupo ensayado, reuniendo en el Pool 1 a aquellos sueros que presentaron los mayores niveles de IgG específica y en el Pool 2 los de menores niveles. Se ensayaron 4 concentraciones seriadas al medio de nBT (1/40, 1/80, 1/160, 1/320) y 3

concentraciones seriadas al medio de anticuerpo (1/100, 1/200, 1/400). El mismo procedimiento se repitió para la rBT, como control positivo. Se partió de suspensiones iniciales de ambas proteínas que presentaron el mismo título de actividad hemolítica frente a GR de carnero (1/2560).

Los pools control 1 y 2 no fueron capaces de inhibir completamente la actividad de la nBT en ninguna de las condiciones ensayadas. Solo pudieron inhibir la lisis de GR a bajas concentraciones de rBT (dilución 1/320). Un comportamiento similar se observó para los pools lisado 1 y 2 donde, en ninguna de las condiciones ensayadas se logró inhibir completamente la hemólisis de GR producida por la nBT. El pool 1, sólo inhibió la acción hemolítica de la rBT a muy bajas concentraciones de la misma (dilución 1/320). Por el contrario, ambas mezclas de sueros del grupo lisado + recombinantes lograron inhibir completamente la lisis de GR en todas las condiciones experimentales ensayadas, para ambas proteínas, aún a altas concentraciones de toxina y bajas de anticuerpos (Figura 34).



**Figura 34.** Evaluación de la inhibición de la actividad hemolítica de las toxinas nBT y rBT por pools de los sueros generados a los 7 días post-parto en vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™, o control.

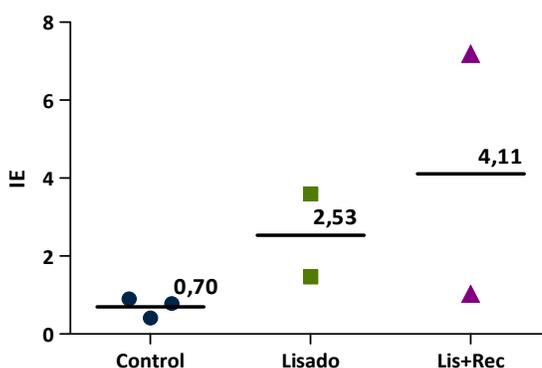
#### V.4.5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

##### V.4.5.1. Linfoproliferación *in vitro*

Con el objetivo de estudiar la respuesta inmune celular y de memoria inducida por las formulaciones, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica a partir de muestras tomadas a los 60 días post-parto. Las mismas se re-estimularon *in vitro* con sus antígenos específicos y se evaluó su capacidad de proliferación.

La puesta a punto de las experiencias y comprobación de la ausencia de componentes capaces de estimular una proliferación inespecífica en las suspensiones de los estímulos *S. aureus* lisado o *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes, se realizó mediante el cultivo y estimulación *in vitro* de células extraídas de animales sanos que no habían sido incluidos en el ensayo de inmunización.

Luego de 24 horas de cultivo, las células se observaron en microscopio invertido a 40X para estimar el estado de activación de las mismas y la ausencia de contaminaciones. De los 9 animales utilizados inicialmente en los experimentos, 1 de cada uno de los grupos inmunizados presentaron contaminaciones bacterianas, con lo cual el número final de animales para dichos grupos resultó igual a 2. Los 7 animales restantes presentaron respuestas linfoproliferativas hacia el estímulo inespecífico (ConA). Luego de 4 días de incubación con los antígenos específicos, un animal del grupo lisado presentó un IE = 3,6, mientras que en un animal del grupo lisado + recombinantes este índice fue de 7,2. No se observó proliferación en las células de los animales control estimuladas con *S. aureus* lisado (Figura 35).



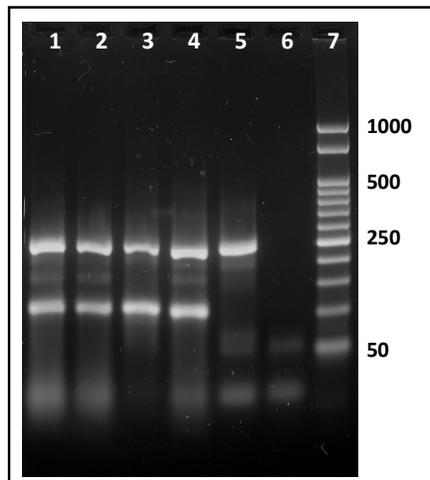
**Figura 35.** Índices de Estimulación linfocitaria (IE) de células mononucleares de sangre periférica obtenida a los 60 días post-parto de vaquillonas inmunizadas con *S. aureus* lisado en Iscom Matrix™, *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes en Iscom Matrix™, o control; estimuladas con *S. aureus* lisado o *S. aureus* lisado + antígenos recombinantes, según corresponda.

#### V.4.6. CARACTERIZACIÓN DE *S. aureus* AISLADOS DE IIM

##### V.4.6.1. Aislamiento

La primera lactancia de las vaquillonas incluidas en el presente ensayo de inmunización se mantuvo por aproximadamente 10 meses. Durante ese período, se controló la aparición de IIM en los animales incluidos en el estudio, para lo cual se obtuvieron muestras mensuales de leche de cuartos mamarios para su análisis bacteriológico. De tres de ellos se aislaron *Staphylococcus coagulasa* positivos, los cuales se confirmaron como *Staphylococcus aureus* mediante una reacción de PCR multiplex (Figura 36).

Un animal del grupo control presentó *S. aureus* (aislamiento N° 5011) en el cuarto anterior derecho, a los dos meses de lactancia, manteniéndose la infección hasta el final de la misma. En los muestreos realizados al noveno y décimo mes de lactancia, la infección se detectó también en los cuartos posteriores derecho e izquierdo de dicho animal. De un segundo animal del grupo control se aisló *S. aureus* (aislamiento N° 5038) en su cuarto posterior derecho, por única vez, al quinto mes de lactancia. Finalmente, una vaquillona del grupo inmunizado con *S. aureus* lisado presentó infección por *S. aureus* (aislamiento N° 5128) en el cuarto posterior derecho a los 2 meses de lactancia. La misma se detectó también en el cuarto posterior izquierdo en el quinto mes de lactancia, sumándose el anterior derecho al mes siguiente. Los 3 cuartos de este animal permanecieron infectados hasta el final de la lactancia.



**Figura 36.** PCR multiplex para la identificación de *S. aureus*.

Evaluación en gel de agarosa al 2% de los productos de reacción obtenidos por PCR a partir de ADN genómico de *S. aureus*. Líneas: 1) *S. aureus* 5011; 2) *S. aureus* 5038; 3) *S. aureus* 5128; 4) *S. aureus* Reynolds; 5) *E. coli* DH5 $\alpha$ ; 6) Blanco de reacción; 7) Marcadores de tamaño de fragmento (50 bp ladder, Productos Bio-Lógicos).

#### V.4.6.2. Evaluación de la presencia de factores de virulencia

Se analizó por PCR, en las 3 cepas de *S. aureus* aisladas de IIM, la presencia de los genes codificantes para las moléculas ClfA, FnBP-A y de los loci *cap5* y *cap8*. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en la Tabla 13. Todas las cepas presentaron los genes para las proteínas ClfA y FnBP-A. Los 3 aislamientos resultaron además tipificables en cuanto a la presencia de los loci capsulares, siendo 2 de ellos CP5 y el restante CP8.

Los microorganismos se caracterizaron también de forma fenotípica, con respecto a su capacidad de expresión de hemolisinas *in vitro*. Todos los aislamientos expresaron al menos 2 toxinas; sin embargo, la distribución de las mismas resultó diferente para cada uno de ellos (Tabla 13).

	Grupo	CP	ClfA	FnBP-A	Hemolisinas
5011	Control	8	x	x	$\beta$ , $\delta$ , trazas $\alpha$
5038	Control	5	x	X	$\alpha$ , $\delta$ , trazas $\beta$
5128	Lisado	5	x	X	$\beta$ , $\delta$ , ausencia $\alpha$

**Tabla 13.** Distribución de los antígenos CP5, CP8, ClfA, FnBP-A y hemolisinas estafilocócicas en *S. aureus* aislados de IIM en vaquillonas.

## V.5. DISCUSIÓN

La estrategia de preparación de inmunógenos a partir de bacterinas o lisados de *S. aureus* suplementados con toxoides inactivados (Watson 1992; Nickerson y col., 1993; Nordhaug y col., 1994a y b; Hwang y col., 2000), productos capsulares (Calzolari y col., 1997; Giraudo y col., 1997) o productos bacterianos extracelulares (Leitner y col., 2003a-c) ha sido utilizada en la inmunización de bovinos, con la finalidad de lograr inmunidad frente a diferentes componentes de *S. aureus*. Sin embargo, no existen antecedentes del uso de inmunógenos compuestos por células enteras inactivadas, o lisadas de *S. aureus*, suplementadas con antígenos recombinantes (Pereira y col., 2011). En esta parte del trabajo se obtuvo un inmunógeno prototípico compuesto por un lisado de células de *S. aureus* de una cepa productora de CP5, y los antígenos recombinantes ClfA, FnBP-A y  $\beta$ -toxina; el cual se formuló con Iscom Matrix<sup>TM</sup>. Su desempeño, en cuanto a la estimulación de respuestas inmunes humorales y celulares específicas en vaquillonas se comparó con el de un inmunógeno preparado con lisado de *S. aureus* CP5 adyuvado con Iscom Matrix<sup>TM</sup>, previamente evaluado.

Coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en este trabajo con diferentes inmunógenos adyuvados con Iscom Matrix<sup>TM</sup>, ambas formulaciones evaluadas generaron fuertes respuestas humorales con producción de IgG e IgG<sub>2</sub> específicas en sangre e IgG en leche, significativamente superiores a las observadas en los animales control. Sin embargo, el agregado de los antígenos recombinantes al lisado de *S. aureus*, disminuyó la respuesta de IgG e IgG<sub>2</sub> anti-lisado en sangre, en comparación a la observada en los animales inmunizados sólo con lisado bacteriano. El inmunógeno multicomponente, por su parte, generó potentes respuestas de anticuerpos hacia los antígenos rBT, rClfA y rFnBPA incluidos en la formulación. Los niveles de IgG específica para los antígenos recombinantes y para el lisado de *S. aureus* observados en este grupo resultaron similares, indicando un balance en la respuesta humoral del huésped hacia todos los componentes del inmunógeno. La disminución en la respuesta humoral hacia el lisado de *S. aureus* y el direccionamiento de la misma hacia las moléculas recombinantes puede explicarse sobre la base de la estructura de las mismas y su interacción con el adyuvante: Los antígenos recombinantes fueron obtenidos por clonado de sus secuencias codificantes en el vector de expresión pET32a, el cual genera proteínas fusionadas a TRX, con el agregado de dos "Tags" de histidina, uno interno y otro en el extremo C-terminal, que facilitan la purificación de las mismas por cromatografía de afinidad (LaVallie y col., 1993). Las partículas de Iscom Matrix<sup>TM</sup> poseen carga negativa, lo que le permitiría interactuar más estrechamente con estos antígenos con colas de aminoácidos positivos y de esta forma

favorecer su “delivery” e incrementar su eficiencia de exposición al sistema inmune del huésped (Pearse y Drane, 2005). De hecho, ha sido ampliamente demostrado que el arreglo repetitivo de epitopes sobre una superficie particulada estimula la producción de fuertes respuestas de anticuerpos (Wilschut, 2009). La metodología de agregado de colas de histidinas ha sido, además, utilizada para aumentar las respuestas inmunes citotóxicas producidas en ratones frente a la inmunización con antígenos recombinantes formulados con Iscom Matrix™ (Malliaros y col., 2004).

Solo los animales inmunizados con la mezcla *S. aureus* lisado y antígenos recombinantes desarrollaron respuestas de IgG específicas para rBT, rClfA y rFnBP-A, tanto en sangre como en leche. En un estudio previo realizado en ratones, la inmunización con dos dosis de una mezcla de plásmidos cargando las secuencias codificantes de 4 adhesinas de *S. aureus*, no generó respuestas humorales igualmente eficientes hacia a las proteínas recombinantes, indicando una diferencia en la inmunodominancia de los antígenos expresados y su habilidad de interacción con las APCs (Castiguolo y col., 2006). En un estudio realizado en vaquillonas, en el cual se aplicaron 2 dosis de una vacuna a ADN para las proteínas ClfA y FnBP-A, sólo se observó un aumento de la respuesta humoral luego de un *booster* con los antígenos recombinantes. Sin embargo, las respuestas específicas hacia FnBP-A resultaron al menos 5 veces inferiores a las dirigidas hacia ClfA (Shkreta y col., 2004). En el presente estudio, en cambio, tanto en sangre como en leche, se observaron niveles similares de IgG específica para los 3 antígenos recombinantes evaluados, indicando una respuesta balanceada del huésped hacia cada uno de los componentes incluidos en la formulación. Se ha observado, que las vacunas a ADN son generalmente menos efectivas en grandes animales que en ratones debido posiblemente a una baja capacidad de expresión de los plásmidos (Babiuk y col., 2003). Los resultados obtenidos en la presente experiencia indicarían que la estrategia de aplicación de 2 dosis de los antígenos recombinantes formulados con Iscom Matrix™, cuya eficiencia en la producción de anticuerpos específicos ha sido previamente demostrada, sería más efectiva para la obtención de las respuestas humorales deseadas en bovinos. Por último, coincidiendo con los resultados observados en experiencias anteriores en este trabajo y en estudios previos (O’ Brien y col 2001), ambas formulaciones desarrollaron niveles de IgG anti-CP5 en sangre similares, demostrando que el tratamiento enzimático de lisis de células de *S. aureus* no afecta la conformación de dicha estructura. Sin embargo, no se detectó IgG anti-CP5 en leche de ninguno de los animales evaluados, en concordancia con las experiencias reportadas previamente en este trabajo con inmunógenos compuestos por bacterinas de *S. aureus* CP5 formuladas con Iscom Matrix™ o Al(OH)<sub>3</sub> y con estudios previos con una vacuna trivalente

comercial (Luby y col., 2007).

La funcionalidad de los anticuerpos generados en cuanto a su capacidad de reconocer *S. aureus* y favorecer su fagocitosis, se evaluó *in vitro* con PMN bovinos. A pesar de las diferencias observadas en los títulos de anticuerpos específicos hacia lisado de *S. aureus* entre los animales de ambos grupos inmunizados, los mismos opsonizaron a *S. aureus* y favorecieron su fagocitosis por PMN bovinos *in vitro*, de manera similar. Por un lado, estas observaciones concuerdan con estudios previos en los cuales, al inmunizar bovinos con un lisado de *S. aureus* incorporado en microesferas (O'Brien y col., 2001), o una mutante avirulenta de *S. aureus* (Pellegrino y col., 2010), los niveles de IgG<sub>2</sub> desarrollados no se relacionaron directamente con la fagocitosis de *S. aureus* *in vitro*. Sin embargo, en experiencias realizadas anteriormente en este trabajo de tesis con células enteras de *S. aureus* formuladas con Iscom Matrix™ o Al(OH)<sub>3</sub>, los mayores títulos de IgG<sub>2</sub> anti-*S. aureus* como anti-CP5 en sangre de los animales del grupo Iscom Matrix™ se relacionaron con una mayor capacidad opsonica de los antiseros. La similitud en la eficiencia de opsonización de *S. aureus* experimentada en este estudio por ambos grupos inmunizados podría explicarse por los niveles similares de IgG anti-CP5 en sangre observados entre ellos, reforzando la hipótesis previamente discutida de que los anticuerpos dirigidos hacia los CPs serían los responsables del aumento de la actividad opsonica de los antiseros (Guidry y col., 1991; Guidry y col., 1994). Si bien la determinación de IgG<sub>2</sub> anti-CP5 no ha sido evaluada en este punto, la determinación de IgG total engloba la presencia de otras Ig con capacidad opsonica, como por ejemplo IgG<sub>1</sub>, la cual también podría contribuir en la opsonofagocitosis de *S. aureus*. Por otra parte, las propiedades antifagocíticas del ClfA, también han sido previamente reportadas (Higgins y col., 2006). De hecho, la inmunización de ratones con regiones peptídicas de ClfA (Gong y col., 2010), como de bovinos con plásmidos codificantes para ClfA (Shkreta y col., 2004; Nour El-Din y col., 2006), generaron anticuerpos específicos que favorecieron la fagocitosis por PMN bovinos *in vitro*. En el presente estudio, una contribución de los anticuerpos dirigidos hacia el fragmento recombinante de ClfA incluido en la formulación multicomponente, podría haber influenciado positivamente en la capacidad opsonica de los sueros obtenidos de los animales de dicho grupo. Sin embargo, esta hipótesis debería ser confirmada mediante la comparación de dichos sueros con los generados por una formulación que solamente incluya ClfA recombinante.

Tanto en el Capítulo III de este trabajo de tesis como en estudios previos (Huseby y col., 2007), se demostró que la  $\beta$ -toxina producida de forma recombinante en células de *E. coli* posee actividad biológica frente a GR de carnero. Sin embargo, dado que no se han reportado antecedentes del uso de dicha molécula en inmunizaciones destinadas al control de IIM por *S.*

*aureus* (Pereira y col., 2011), no se ha evaluado si los anticuerpos dirigidos contra ella serían capaces de neutralizar las acciones de la toxina nativa de *S. aureus*. Ensayos de Western Blot realizados en este trabajo, mostraron la capacidad de los anticuerpos generados por la formulación con lisado de *S. aureus* y los antígenos rBT, rClfA y rFnBPA, de reconocer a la nBT de *S. aureus* presente en sobrenadante de cultivo del microorganismo. Esto concordaría con los análisis de secuenciación de la rBT previamente reportados en este trabajo de tesis, en los cuales no se observaron alteraciones en la secuencia génica clonada, que puedan traducirse a modificaciones en los aminoácidos de la proteína obtenida, respecto de la secuencia reportada en GenBank (Projan y col., 1989). Además, se evaluó *in vitro* la capacidad de estos anticuerpos de neutralizar la actividad hemolítica de la  $\beta$ -toxina nativa frente a GR de carnero. Aún a altas concentraciones de nBT, los anticuerpos generados por la inmunización con la formulación multicomponente inhibieron completamente la acción lítica de la toxina. Estos resultados concuerdan con los observados para otros antígenos de *S. aureus* obtenidos de forma recombinante, en los cuales, los anticuerpos generados contra ellos fueron capaces de inhibir la unión a las moléculas por cuales presentan afinidad y neutralizar sus acciones biológicas (Schennings y col., 1993; Huesca y col., 2000). Sin embargo, la confirmación de la funcionalidad de los anticuerpos anti-rBT debería evaluarse *in vivo* en modelos experimentales.

Debido a la naturaleza intracelular de *S. aureus*, la inducción de respuestas inmunes celulares, especialmente de tipo citotóxicas, serían requeridas para la protección del huésped frente a las IIM causadas por dicho microorganismo (Wallemacq y col., 2012). La respuesta inmune celular y de memoria inducida por las formulaciones se evaluó mediante la re-estimulación antígeno-específica de células mononucleares de sangre periférica obtenida a los 2 meses post-parto, tanto de animales de ambos grupos inmunizados como de animales control. Sólo se contó con muestras de 2 vaquillonas de cada uno de los grupos inmunizados, lo cual impidió la realización de test estadísticos. Sin embargo, se observó, que un animal de cada uno de los grupos inmunizados presentó IE elevados, en comparación con los de los animales control. Si bien estudios complementarios con mayor cantidad de animales son necesarios, las respuestas linfoproliferativas desarrolladas en las muestras obtenidas a los 75 días de aplicada la última dosis de vacuna en las vaquillonas inmunizadas sugieren la presencia de clones de linfocitos específicos para el inmunógeno y el desarrollo de respuestas de memoria. Además, ensayos preliminares, indican la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a los estímulos específicos en los animales inmunizados (No mostrado), sugiriendo la capacidad de las formulaciones de inducir respuestas citotóxicas. En un estudio previo donde se inmunizaron vaquillonas con dos dosis de células enteras de *S. aureus* CP5, o CP5 conjugado a

albúmina sérica humana, células mononucleares de sangre periférica extraídas luego de 1 año de inmunización desarrollaron respuestas linfoproliferativas *in vitro* hacia CP5 purificado superiores a la de los controles sin inmunizar (Tollersrud y col., 2001). No obstante, el limitado número de animales incluidos en dicho estudio impidió la detección de diferencias estadísticamente significativas. En otro estudio posterior, la inmunización de vaquillonas preñadas con una mezcla de plásmidos codificantes para fragmentos peptídicos de los antígenos ClfA y FnBP-A, desarrolló respuestas linfoproliferativas significativas luego de la estimulación *in vitro* de células mononucleares con los antígenos recombinantes (Shkreta y col., 2004). Sin embargo, la respuesta humoral hacia los péptidos recombinantes inducida por la formulación resultó baja. Estas observaciones hicieron sugerir a los autores que la inmunización con vacunas a ADN activarían preferiblemente linfocitos T CD4+ y CD8+, en lugar de linfocitos B.

Entre los principales objetivos de la vacunación contra mastitis bovinas por *S. aureus*, se encuentra la disminución de la aparición de nuevas IIM, y por lo tanto, del contagio entre animales (Middleton, 2008). De las 24 vaquillonas que cumplieron con los criterios de elegibilidad para el estudio, y que se evaluaron bacteriológicamente durante toda la lactancia, una de cada uno de los grupos control y lisado presentaron IIM por *S. aureus*, mientras que un segundo animal control mostró una infección transitoria. Ninguno de los animales que recibieron la formulación con lisado de *S. aureus* y antígenos recombinantes presentó infección por el microorganismo en condiciones de exposición natural. La inmunización de 452 vaquillonas Holstein preñadas con 2 dosis de la vacuna MASTIVAC®, indujo la producción de anticuerpos específicos en sangre de las vaquillonas inmunizadas, significativamente mayores que los hallados en los animales control. Sin embargo, un número muy reducido de animales presentaron infección por *S. aureus* durante el período de estudio, por lo que no pudo evaluarse estadísticamente la protección específica estimulada por la vacuna (Leitner y col., 2003c). En un ensayo de inmunización con la vacuna Lysigin™ en condiciones de exposición natural realizado en un hato con una baja prevalencia (3%) de IIM por *S. aureus*, no se observaron diferencias entre los grupos vacunado y control respecto de la incidencia de nuevas IIM por este organismo o del recuento de células somáticas (Middleton y col., 2009). Si bien la aparición de nuevas IIM resultó baja (6 cuartos en total), los resultados obtenidos en este ensayo experimental, sugerirían un efecto protector ejercido en las vaquillonas por la inmunización con la formulación multicomponente. Estudios de desafío experimentales y ensayos a campo, serán realizados en el futuro para caracterizar la respuesta inmune de vaquillonas inmunizadas frente a la IIM por *S. aureus*, así como la capacidad de protección de

la formulación frente a infecciones naturales.

Coincidiendo con estudios previos en donde se observó la elevada prevalencia de los genes para los antígenos FnBP o Clf de *S. aureus* tanto de cepas humanas como bovinas (Rice y col., 2001; Mongodin y col., 2002; Gonano y col. 2009; Ote y col., 2011; Klein y col., 2012), las 3 cepas aisladas de IIM en este estudio presentaron los genes codificantes para dichas moléculas. Los 3 aislamientos resultaron además genotipificables para los polisacáridos capsulares; presentando dos de ellos los loci *cap5* y el restante el *cap8*; siendo estos tipos capsulares los más prevalentes en nuestro país (Camussone y col., 2012). Por otra parte, si bien no fue posible la realización de análisis estadísticos de asociación entre el genotipo/fenotipo del microorganismo aislado y las características de la IIM desarrollada, se observó que los microorganismos que desarrollaron infecciones crónicas producían  $\beta$ -toxina *in vitro*, mientras que la cepa que se aisló sólo en una oportunidad, expresó  $\alpha$ -toxina y sólo trazas de  $\beta$ . En un estudio previo en el que se infectaron glándulas mamarias de ratones con cepas mutantes que expresan toxina  $\beta$  pero no  $\alpha$ , los recuentos bacterianos luego de 48 horas resultaron superiores con respecto a los observados en animales infectados con la cepa doblemente mutante, sugiriendo un rol de la proteína en la virulencia *in vivo* (Bramley y col., 1989). Cifrian y col. (1996a) observaron que una cepa mutante de *S. aureus* en el gen de  $\beta$ -toxina presentó una menor adherencia en un cultivo primario de células epiteliales mamarias y una menor proliferación en comparación con la cepa parental, por lo que sugirieron que la  $\beta$ -toxina podía favorecer la colonización de la glándula mamaria bovina por *S. aureus*.

En conclusión, un inmunógeno prototípico compuesto por células lisadas de *S. aureus* y suplementado con las moléculas rBT, rClfA y rFnBPA, potenció las respuestas de anticuerpos dirigidas hacia los antígenos recombinantes, los cuales resultaron eficientes en la opsonización del microorganismo y en la neutralización de sus factores de virulencia *in vitro*, posicionándolos como buenos candidatos para ser incorporados en una formulación destinada a la inmunoprofilaxis de la mastitis bovina.

## CONCLUSIONES

1- Se compararon las respuestas inmunes generadas en bovinos por bacterinas de *S. aureus* CP5, formuladas con un adyuvante tradicional y un adyuvante de nueva generación. La formulación del inmunógeno experimental con Iscom Matrix™ potenció la respuesta inmune humoral a través de la producción de IgG específica en sangre y leche y un significativo incremento de los títulos de IgG<sub>2</sub> sanguíneos, lo cual aumentó la capacidad opsónica en comparación con la formulación con Al(OH)<sub>3</sub>.

2- Se obtuvo una molécula recombinante de β-toxina de *S. aureus*, que presentó actividad hemolítica para glóbulos rojos de carnero.

3- Se compararon las respuestas inmunes generadas en bovinos por una bacterina y un lisado de *S. aureus* CP5 formulados con Iscom Matrix™. Ambos inmunógenos indujeron potentes respuestas humorales específicas en sangre y leche, con anticuerpos capaces de favorecer la fagocitosis del microorganismo por PMN bovinos e inhibir su internalización en células epiteliales mamarias. La formulación con lisado bacteriano mostró un mejor desempeño en cuanto a la producción de anticuerpos específicos y estimulación de citoquinas regulatorias e inflamatorias con potencial importancia en el control de IIM por *S. aureus*.

4- Se obtuvo un inmunógeno prototípico compuesto por lisado de *S. aureus* CP5, suplementado con las moléculas rBT, rClfA y rFnBPA y formulado con Iscom Matrix™. Su desempeño se comparó en bovinos con el de una formulación compuesta sólo por células lisadas de *S. aureus*. La inmunización de vaquillonas con el inmunógeno multicomponente potenció la respuesta de anticuerpos en sangre y leche dirigidos hacia los antígenos recombinantes. Los mismos resultaron eficientes en la opsonización del microorganismo y en la neutralización de la actividad de la β-toxina nativa de *S. aureus in vitro*, posicionando a estos componentes como buenos candidatos para ser incorporados en una formulación destinada a la inmunoprofilaxis de las IIM bovinas causadas por *S. aureus*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F.M.; Larsen, H.D.; Eriksen, N.H.; Elsberg, C.S. y Jensen N.E. (1999) *Frequency of alpha- and beta-haemolysin in Staphylococcus aureus of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression*. APMIS. 107:425-30.
- Alluwaimi, A.M.; Leutenegger, C.M.; Farver, T.B.; Rossitto, P.V.; Smith, W.L. y Cullor, J.S. (2003) *The cytokine markers in Staphylococcus aureus mastitis of bovine mammary gland*. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 50:105-11.
- Almeida, R.A.; Matthews, K.R.; Cifrian, E.; Guidry, J. y Oliver S.P. (1996). *Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells*. J. Dairy Sci. 79: 1021-1026.
- Anderson, J.C. (1982) *Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunization and therapy*. Vet. Rec. 110:372-376.
- Anderson, J.C. (1983) *Veterinary aspects of staphylococci*. En: *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Vol. 1. (Eds.: Easmon, C.S.F. y Adlam, C.). Academic Press, Londres- Nueva York, p. 193-241.
- Angelini, D.J.; Hasday, J.D.; Goldblum, S.E. y Bannerman D.D. (2005) *Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated pulmonary endothelial barrier dysfunction*. Curr. Respir. Med. Rev. 1:233-246.
- Asai, K.; Kai, K.; Rikiishi, H.; Sugawara, S.; Maruyama, Y.; Yamaguchi, T.; Ohta, M.; y Kumagai, K. (1998). *Variation in CD4C T and CD8C T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods*. Vet. Immunol. Immunopathol. 65:51-61.
- Asociación Argentina de Lucha contra Mastitis, ALMAST. (1983) *Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina*. Com. Fed. Lechería Arch. Lechería 6:73.
- Babiuk, L.A.; Pontarollo, R.; Babiuk, S.; Loehr, B. y van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2003) *Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals*. Vaccine. 21:649-658.
- Bannerman, D. D.; Paape, M.J.; Goff, J.P.; Kimura, K.; Lippolis, J.D. y Hope, J.C. (2004a). *Innate immune response to intramammary infection with Serratia marcescens and Streptococcus uberis*. Vet. Res. 35:681-700.
- Bannerman, D. D.; Paape, M.J.; Lee, J.W.; Zhao, X.; Hope, J.C.; Rainard, P. (2004b). *Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11:463-472.
- Barksby, H.E.; Lea, S. R.; Preshaw, P.M. y Taylor, J.J. (2007). *The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders*. Clin. Exp. Immunol. 149:217-225.
- Barrio, M.B.; Rainard, P.; Gilbert, F.B. y Poutrel B. (2003) *Assessment of the opsonic activity of purified bovine sIgA following intramammary immunization of cows with Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 86:2884-2894.

- Bishop, J.G.; Schanbacher, F.L.; Ferguson, L.C. y Smith K.L. (1976) *In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin*. Infect. Immun. 14:911-918.
- Bonfield, J.K.; Smith, K.F. y Staden, R. (1995) *A new DNA sequence assembly program*. Nucleic Acids Res. 23:4992-4999.
- Bramley, A.J.; Patel, A.H.; O'Reilly, M.; Foster, R. y Foster, T.J. (1989) *Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of Staphylococcus aureus for the mouse mammary gland*. Infect. Immun. 57:2489-2494.
- Brock, J.H.; Steel, E.D. y Reiter, B. (1975) *The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by Staphylococcus aureus*. Res. Vet. Sci. 19:152-158.
- Brouckaert, P. y Fiers, W. (1996) *Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 216:167-187.
- Brouillette, E.; Lacasse, P.; Shkreta, L.; Bélanger, J.; Grondin, G.; Diarra, M.S.; Fournier, S. y Talbot, B.G. (2002) *DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of Staphylococcus aureus*. Vaccine 20:2348-2357
- Brouillette, E.; Talbot, B.G. y Malouin, F. (2003) *The fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis*. Infect. Immun. 71:2292-2295.
- Brown, M.A. y Hural, J. (1997) *Functions of IL-4 and control of its expression*. Crit. Rev. Immunol. 17:1-32.
- Bryce, L.M. y Rountree, P.M. (1936) *The production of  $\beta$ -toxin by staphylococci*. J. Pathol. 43:173-189.
- Bryceson, Y.T.; March, M.E.; Ljunggren, H.G. y Long, E.O. (2006) *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. Immunol Rev. 214:73-91.
- Burton, J.L. y Erskine, R.J. (2003) *Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease*. Vet. Clin. N. Am-Food A. 19:1-45.
- Caffin, J.P.; Poutrel, B. (1988) *Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk*. J. Dairy Sci. 71:2035-2043.
- Calvino, L.F. y Dodd, K. (1994) *Frequency and distribution of hemolysins of Staphylococcus-aureus isolated from bovine mastitic milk in Ireland*. Irish Vet. J. 47:53-57.
- Calvino, L.F. y Oliver, S.P. (1998) *Characterization of mechanisms involved in uptake of Streptococcus dysgalactiae by bovine mammary epithelial cells*. Vet. Microbiol. 63:261-74.
- Calvino, L.F. y Tirante, L. (2005). *Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años*. Rev. FAVE, Sección Cs. Vet. 4:29-40.
- Calvino, L.F.; Almeida, R.A. y Oliver, S.P. (1996) *Influence of Streptococcus dysgalactiae surface hydrophobicity on adherence to mammary epithelial cells and phagocytosis by mammary macrophages*. Zentralbl. Veterinarmed. B. 43:257-266.

- Calvino, L.F.; Donnelly, W.J. y Dodd, K. (1993) *Effect of partially purified Staphylococcus aureus Beta-haemolysin on the mammary gland of the mouse*. J. Vet. Med. 40:559-568.
- Calzolari, A.; Giraudo, J.A.; Rampone, H.; Odierno, L.; Giraudo, A.T.; Frigerio, C.; Bettera, S.; Raspanti, C.; Hernández, J.; Wehbe, M.; Mattea, M.; Ferrari, M.; Larriestra, A. y Nagel, R. (1997) *Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds*. J. Dairy Sci. 80:854-858.
- Camussone, C.; Rejf, P.; Pujato, N.; Schwab, A.; Marcipar, I. y Calvino, L. (2012) *Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus isolated from bovine intramammary infections in Argentina*. Braz. J. Microbiol. 43:1010-1014.
- Camussone, C.; Signorini, M.; Galarza, R.; Rejf, P.; Marcipar, I. y Calvino, L. (2010) *Respuesta inmune humoral contra una bacteria de S. aureus CP5 en vaquillonas empleando dos vías de inoculación*. Rev FAVE. Sec Cs. Vet. 9:50-57.
- Castagliuolo, I.; Piccinini, R.; Beggiao, E.; Palù, G.; Mengoli, C.; Ditadi, F.; Vicenzoni, G. y Zecconi, A. (2006) *Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice*. Vaccine 24:4393-4402.
- Cifrian, E.; Guidry, A.J.; Bramley, A.J.; Norcross, N.L.; Bastida-Corcuera, F.D. y Marquardt, W.W. (1996a) *Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of Staphylococcus aureus to bovine mammary epithelial cells*. Vet. Microbiol. 48:187-198.
- Cifrian, E.; Guidry, A.J.; O'Brien, C.N. y Marquardt, W.W. (1996b) *Effect of antibodies to staphylococcal alpha and beta toxins and Staphylococcus aureus on the cytotoxicity for and adherence of the organism to bovine mammary epithelial cells*. Am J Vet Res. 57:1308-1311.
- Coleman, D.; Knights, J.; R. Russell, R.; Shanley, D.; Birkbeck, T. H.; Dougan, G. y Charles, I. (1991) *Insertional inactivation of the Staphylococcus aureus beta-toxin by bacteriophage phi 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the phi 13 genome*. Mol. Microbiol. 5:933-939.
- Cuesta, G.; Suarez, N.; Bessio, M.I.; Ferreira, F. y Massaldi, H. (2003) *Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method*. J. Microbiol. Methods 52:69-73.
- Cui, J.C.; Zhang, B.J.; Lin, Y.C.; Wang, Q.K.; Qian, A.D.; Nakane, A.; Hu, D.L. y Tong, G.Z. (2010) *Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against Staphylococcus aureus-induced bovine mastitis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 135:64-70.
- Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Ortega, H.H.; Tumini, M.; Canavesio, V.R.; Neder, V.E.; Calvino, L.F. (2009) *Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor-alpha in Staphylococcus aureus-infected mammary glands at drying off*. Vet. Immunol. Immunopathol. 132:237-42.
- De Vliegher, S.; Fox, L.K.; Piepers, S.; McDougall, S. y Barkema, H.W. (2012) *Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control*. J. Dairy Sci. 95:1025-1040.
- Dinarello, C.A. (1996) *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood 87:2095-2147.
- Dubois, M.; Giles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) *Colorimetric Method for Determination of Sugars and related Substances*. Anal. Chem. 28:350-356.

- Dziewanowska, K.; Patti, J.M.; Deobald, C.F.; Bayles, K.W.; Trumble, W.R. y Bohach, G.A. (1999) *Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of Staphylococcus aureus by epithelial cells*. Infect. Immun. 67:4673-4678.
- Estes, D.M. (1996) *Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression*. Vet. Immunol. Immunopathol. 54:61-67.
- Fattom, A.; Schneerson, R.; Szu, S.; Vann, W.; Shiloach, J.; Karakawa, W. y Robbins, J. (1990) *Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to Pseudomonas aeruginosa exotoxin A*. Infect. Immun. 58:2367-2374.
- Federation of Animal Sciences Societies, FASS (1999) *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching*. Federation of Animal Sciences Societies, Champaign, Illinois, EE.UU.
- Foster, T.J. (1991) *Potential for vaccination against infections caused by Staphylococcus aureus*. Vaccine 9:221-227.
- Foster, T.J. (2005) *Immune evasion by staphylococci*. Nat. Rev. Microbiol. 3:948-958.
- Foster, T.J. y Höök, M. (1998) *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 6:484-488.
- Fournier, C.; Kuhnert, P.; Frey, J.; Miserez, R.; Kirchhofer, M.; Kaufmann, T.; Steiner, A. y Graber, H.U. (2008) *Bovine Staphylococcus aureus: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome*. Res. Vet. Sci. 85:439-448.
- Fowler, T.; Wann, E.R.; Joh, D.; Johansson, S.; Foster, T.J. y Höök, M. (2000) *Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins*. Eur. J. Cell. Biol. 79:672-679.
- Gaudreau, M.C.; Lacasse, P. y Talbot, B.G. (2007) *Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against Staphylococcus aureus*. Vaccine 25:814-824.
- Gilbert, F.B.; Poutrel, B. y Sutra, L. (1994) *Immunogenicity in cows of Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide-ovalbumin conjugate*. Vaccine 12:369-374.
- Giraud, J.A.; Calzolari, A.; Rampone, H.; Rampone, A.; Giraud, A.T.; Bogni, C.; Larriestra, A. y Nagel, R. (1997) *Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers*. J. Dairy Sci. 80:845-853.
- Gonano, M.; Hein, I.; Zangerl, P.; Rammelmayr, A. y Wagner, M. (2009) *Phenotypic and molecular characterization of Staphylococcus aureus strains of veterinary, dairy and human origin*. Epidemiol. Infect. 137:688-699.
- Gong, R.; Hu, C.; Xu, H.; Guo, A.; Chen, H.; Zhang, G. y Shi, L. (2010) *Evaluation of clumping factor A binding region A in a subunit vaccine against Staphylococcus aureus-induced mastitis in mice*. Clin. Vaccine Immunol. 17:1746-1752.
- González, R.N.; Giraud, J.A.; Busso, J.J. y Heredia, R. (1977) *Investigación en mastitis subclínicas. I Pérdidas económicas*. Rev. Med. Vet. 58:431-438.

- Gouwy, M.; Struyf, S.; Proost, P.; y Van Damme, J. (2005) *Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response*. Cytokine Growth Factor Rev. 16:561-580.
- Gresham, H.D.; Lowrance, J.H.; Caver, T.E.; Wilson, B.S.; Cheung, A.L. y Lindberg, F.P. (2000) *Survival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection*. J. Immunol. 164:3713-3722.
- Guidry, A.; Fattom, A.; Patel, A. y O'Brien, C. (1997) *Prevalence of capsular serotypes among Staphylococcus aureus isolates from cows with mastitis in the United States*. Vet. Microbiol. 59:53-58.
- Guidry, A.J. y Miller, R.H. (1986) *Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity*. J. Dairy Sci. 69:1799-1805.
- Guidry, A.J.; Butler, J.E.; Pearson, R.E. y Weinland, B.T. (1980) *IgA, IgG1, IgG2, IgM, and BSA in serum and mammary secretion throughout lactation*. Vet. Immunol. Immunopathol. 1:329-341.
- Guidry, A.J.; O'Brien, C.N.; Oliver, S.P.; Dowlen, H.H. y Douglass, L.W. (1994) *Effect of whole Staphylococcus aureus and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule*. J. Dairy Sci. 77:2965-2974.
- Guidry, A.J.; Oliver, S.P.; Squiggins, K.E.; Erbe, E.F.; Dowlen, H.H.; Hambleton, C.N. y Berning, L.M. (1991) *Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 74:3360-3369
- Guidry, A.J.; Ost, M.; Mather, I.H.; Shainline, W.E. y Weinland, B.T. (1983) *Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of Escherichia coli endotoxin into the mammary gland*. Am. J. Vet. Res. 44:2262-2267.
- Gutman, G.; Guiguet, E. y Rebolini, J. (2003) *Los ciclos en el complejo lácteo argentino. Análisis de políticas lecheras en países seleccionados*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. [www.alimentosargentinos.gov.ar/programa\\_calidad/Estudio\\_Lacteo.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Estudio_Lacteo.pdf)
- Hair, P.S.; Echague, C.G.; Sholl, A.M.; Watkins, J.A.; Geoghegan, J.A.; Foster, T.J. y Cunnion, K.M. (2010) *Clumping factor A interaction with complement factor I increases C3b cleavage on the bacterial surface of Staphylococcus aureus and decreases complement-mediated phagocytosis*. Infect. Immun. 78:1717-1727.
- Hall, T.A. (1999) *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95-98.
- Hallberg, J.W.; Dame, K.J.; Chester, S.T.; Miller, C.C.; Fox, L.K.; Pankey, J.W.; Nickerson, S.C. y Weaver, L.J. (1995) *The visual appearance and somatic cell count of mammary secretions collected from primigravid heifers during gestation and early postpartum*. J. Dairy Sci. 78:1629-1636.
- Han, H.R.; Pak, S. y Guidry, A. (2000) *Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitic milk and protection of S. aureus infection in mice with CP vaccine*. J. Vet. Med. Sci. 62:1331-1333.
- Hartford, O.; Francois, P.; Vaudaux, P. y Foster, T.J. (1997) *The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the Staphylococcus aureus cell surface*. Mol. Microbiol. 25:1065-1076.
- Hawiger, J.; Timmons, S.; Strong, D.D.; Cottrell, C.A.; Riley, M. y Doolittle, R.F. (1982) *Identification of*

*a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor.* Biochemistry 21:1407-1413.

- Hebert, A.; Sayasith, K.; Senechal, S.; Dubreuil, P. y Lagace, J. (2000) *Demonstration of intracellular Staphylococcus aureus in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk.* FEMS Microbiol. Lett. 193:57-62.
- Hensen, S.M.; Pavčić, M.J.; Lohuis, J.A.; de Hoog, J.A. y Poutrel, B. (2000) *Location of Staphylococcus aureus within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ.* J. Dairy Sci. 83:1966-1975.
- Herbelin, C.; Poutrel, B.; Gilbert, F.B. y Rainard, P. (1997) *Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with staphylococcal alpha-toxin.* J. Dairy Sci. 80:2025-2034.
- Higgins, J.; Loughman, A.; van Kessel, K.P. van Strijp, J.A. y Foster, T.J. (2006) *Clumping factor A of Staphylococcus aureus inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes.* FEMS Microbiol. Lett. 258:290-296.
- Hillerton, J.E. y Walton, A.W. (1991) *Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter.* Vet. Rec. 128:513-515.
- Hoebe, K.; Janssen, E. y Beutler, B. (2004) *The interface between innate and adaptive immunity.* Nat. Immunol. 5:971-974.
- HogenEsch, H. (2002) *Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants.* Vaccine 20:S34-S39.
- Hu, S.; Concha, C.; Lin, F. y Persson Waller, K. (2003) *Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against Staphylococcus aureus in dairy cattle.* Vet. Immunol. Immunopathol. 91:29-37.
- Huesca, M.; Sun, Q.; Peralta, R., Shivji, G.M.; Sauder, D.N. y McGavin, M.J. (2000) *Synthetic peptide immunogens elicit polyclonal and monoclonal antibodies specific for linear epitopes in the D motifs of Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein, which are composed of amino acids that are essential for fibronectin binding.* Infect. Immun. 68:1156-1163.
- Huseby, M.; Shi, K.; Brown, C.K.; Digre, J.; Mengistu, F.; Seo, K.S.; Bohach, G.A.; Schlievert, P.M.; Ohlendorf, D.H. y Earhart, C.A. (2007) *Structure and biological activities of beta toxin from Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol. 189:8719-8726.
- Huynh, H.T.; Robitaille, G. y Turner, J.D. (1991) *Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation.* Exp. Cell. Res. 197:191-199.
- Hwang, C.Y.; Pak, S.I. y Han, H.R. (2000) *Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with Staphylococcus aureus subclinical mastitis.* J. Vet. Med. Sci. 62:875-880.
- Jensen, P.T. y Christensen, K. (1975) *Genetic analysis of the serum level of IgG2 and total protein in Red Danish cattle.* J. Anim. Sci. 40:392-396.
- Jones, R.C.; Deck, J.; Edmondson, R.D. y Hart, M.E. (2008) *Relative quantitative comparisons of the extracellular protein profiles of Staphylococcus aureus UAMS-1 and its sarA, agr, and sarA agr regulatory*

*mutants using one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and nanocapillary liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.* J. Bacteriol. 190:5265-5278.

- Jonsson, K.; Signas, C.; Muller, H.P. y Lindberg, M. (1991) *Two different genes encode fibronectin binding proteins in Staphylococcus aureus. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene.* Eur. J. Biochem. 202:1041-1048.
- Josefsson, E.; Hartford, O.; O'Brien, L.; Patti, J.M. y Foster, T. (2001) *Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant.* J. Infect. Dis. 184:1572-1580.
- Kanangat, S.; Postlethwaite, A.; Cholera, S.; Williams, L. y Schaberg, D. (2007) *Modulation of virulence gene expression in Staphylococcus aureus by interleukin-1beta: novel implications in bacterial pathogenesis.* Microbes Infect. 9:408-415.
- Karakawa, W.W. y Vann, W.F. (1982) *Capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus.* Semin. Infect. Dis. 4:285-293.
- Karakawa, W.W.; Fournier, J.M.; Vann, W.F.; Arbeit, R.; Schneerson, R.S. y Robbins, J.B. (1985). *Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of Staphylococcus aureus.* J. Clin. Microbiol. 22:445-447.
- Karakawa, W.W.; Sutton, A.; Schneerson, R.; Karpas, A. y Vann, W.F. (1988) *Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated Staphylococcus aureus by human polymorphonuclear leukocytes.* Infect. Immun. 56:1090-1095.
- Kauf, A.C.; Rosenbusch, R.F.; Paape, M.J. y Bannerman, D.D. (2007) *Innate immune response to intramammary Mycoplasma bovis infection.* J. Dairy Sci. 90:3336-3348.
- Kehrl, M.E. Jr. y Harp, J.A. (2001) *Immunity in the mammary gland.* Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17:495-516.
- Kehrl, M.E. Jr.; Nonnecke, B.J. y Roth, J.A. (1989) *Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period.* Am. J. Vet. Res. 50:207-214.
- Kerro Dego, O.; Van Dijk, J. y Nederbragt, H. (2002) *Factors involved in the early pathogenesis of bovine Staph. aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion.* Vet. Q. 24:181-198.
- Klein, R.C.; Fabres-Klein, M.H.; Brito, M.A.; Fietto, L.G. y Ribon Ade, O. (2012) *Staphylococcus aureus of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes.* Vet. Microbiol. 160:183-188.
- Korhonen, H.; Marnila, P. y Gill, H.S. (2000) *Milk immunoglobulins and complement factors.* Br. J. Nutr. 84:S75-S80.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227:680-685.
- Lammers, A.; Nuijten, P.J. y Smith, H.E. (1999) *The fibronectin binding proteins of Staphylococcus aureus are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells.* FEMS Microbiol Lett. 180:103-109.
- Lanier, L.L. (2005) *NK cell recognition.* Annu. Rev. Immunol. 23:225-274.

- Larriestra, A. y Vissio, C. (2012) Mastitis: pérdidas económicas, frecuencia y variantes de la enfermedad. ¿Cuántos \$\$ se lleva la mastitis? Producir XXI Bs. As. 20:28-32.
- Larsen, H.D.; Aarestrup, F.M. y Jensen, N.E. (2002) *Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Europe and USA*. Vet. Microbiol. 85:61-67.
- LaVallie, E.R.; DiBlasio, E.A.; Kovacic, S.; Grant, K.L.; Schendel, P.F. y McCoy, J.M. (1993) *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. Biotechnology (N Y) 11:187-193.
- Lee, C.Y. y Lee, J.C. (2006) *Staphylococcal capsule*. En: *Gram-positive pathogens* (Eds: Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A. y Rood, J.I.) ASM Press, Washington DC, EE.UU., p. 456-463.
- Lee, E-K. y Kehrl, M.E. Jr. (1998) *Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves*. Am. J. Vet. Res. 59:37-43.
- Lee, J. W.; Bannerman, D.D.; Paape, M.J.; Huang, M.K. y Zhao, X. (2006) *Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with Escherichia coli or Staphylococcus aureus by real-time PCR*. Vet. Res. 37:219-229.
- Lee, J. W.; Paape, M.J.; Elsasser, T.H. y Zhao, X. (2003) *Recombinant soluble CD14 reduces severity of intramammary infection by Escherichia coli*. Infect. Immun. 71:4034-4039.
- Lee, J.W.; O'Brien, C.N.; Guidry, A.J.; Paape, M.J.; Shafer-Weaver, K.A. y Zhao, X. (2005) *Effect of a trivalent vaccine against Staphylococcus aureus mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis*. Can. J. Vet. Res. 69:11-18.
- Leitner, G.; Lubashevsky, E.; Glickman, A.; Winkler, M.; Saran, A. y Trainin, Z. (2003a) *Development of a Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials*. Vet. Immunol. Immunopathol. 93:31-38.
- Leitner, G.; Lubashevsky, E. y Trainin, Z. (2003b) *Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows, composition and evaluation of its immunogenicity in a mouse model*. Vet. Immunol. Immunopathol. 93:159-167.
- Leitner, G.; Yadlin, N.; Lubashevsky, E.; Ezra, E.; Glickman, A.; Chaffer, M.; Winkler, M.; Saran, A. y Trainin, Z. (2003c) *Development of a Staphylococcus aureus vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial*. Vet. Immunol. Immunopathol. 93:153-158.
- Low, D.K.R. y Freer, J.H. (1977) *The purification of  $\beta$ -lysin (sphingomyelinase C) from Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 2:139-143.
- Lowy, F.D. (1998) *Staphylococcus aureus infections*. N. Engl. J. Med. 339:520-532.
- Luby, C.D.; Middleton, J.R.; Ma, J.; Rinehart, C.L.; Bucklin, S.; Kohler, C. y Tyler, J.W. (2007) *Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a Staphylococcus aureus bacterin (Lysigin™)*. J. Dairy Res. 74:239-246.
- Ma, J.; Cocchiario, J. y Lee, J.C. (2004) *Evaluation of serotypes of Staphylococcus aureus strains used in the production of a bovine mastitis bacterin*. J. Dairy Sci. 87:178-182.
- Mallard, B.A.; Burnside, E.B.; Burton, J.H. y Wilkie, B.N. (1983) *Variation in serum immunoglobulins in*

*Canadian Holstein-Friesians*. J. Dairy Sci. 66:862-866.

- Mallard, B.A.; Dekkers, J.C.; Ireland, M.J.; Leslie, K.E.; Sharif, S.; Van Kampen, C.L.; Wagter, L. y Wilkie, B.N. (1998) *Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health*. J. Dairy Sci. 81:585-595.
- Malliaros, J.; Quinn, C.; Arnold, F.H.; Pearse, M.J.; Drane, D.P.; Stewart, T.J. y Macfarlan, R.I. (2004) *Association of antigens to ISCOMATRIX adjuvant using metal chelation leads to improved CTL responses*. Vaccine. 22:3968-3975.
- Mamo, W.; Fröman, G. y Wadström, T. (1986) *Bacterial adhesion as virulence factor in bovine mastitis: possible role of cell surface hydrophobicity, capsule, fibronectin, fibrinogen and collagen binding*. En: *Proc. Symp: Mast. Cont. Hyg. Prod. Milk*. Espoo, Finland. p. 77-87.
- Mamo, W.; Per, J. y Müller H.P. (1995) *Opsonization of Staphylococcus aureus with a fibronectin-binding protein antiserum induces protection in mice*. Microb. Pathogenesis 19:49-55.
- Marshall, M.J.; Bohach, G.A. y Boehm, D.F. (2000) *Characterization of Staphylococcus aureus beta-toxin induced leukotoxicity*. J. Nat. Toxins 9:125-138.
- Martineau, F.; Picard, F.J.; Roy, P.H.; Ouellette, M. y Bergeron, M.G. (1998) *Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36:618-623.
- Martínez-Pulgarín, S.; Domínguez-Bernal, G.; Orden, J.A. y de la Fuente, R. (2009) *Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in Staphylococcus aureus leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models*. Microbiology 155:1505-1515.
- McCartney, A.C. y Arbuthnott, J.P. (1978) *Mode of action of membrane-damaging toxins produced by staphylococci*. En: *Bacterial Toxins and Cell Membranes*. (Eds: Jeljaszewicz, J.) Academic Press, Londres, p. 89-127.
- McDevitt, D.; Nanavaty, T.; House-Pompeo, K.; Bell, E.; Turner, N.; McIntire, L.; Foster, T. y Höök, M. (1997) *Characterization of the interaction between the Staphylococcus aureus clumping factor (ClfA) and fibrinogen*. Eur. J. Biochem. 247:416-424.
- McKenney, D.; Pouliot, K.L.; Wang, Y.; Murthy, V.; Ulrich, M.; Doring, G.; Lee, J.C.; Goldmann, D.A. y Pier, G.B. (2000) *Vaccine potencial of poly-1-6 B-D-N- succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*. J. Biotechnol. 83:37-44.
- Middleton, J.R. (2008) *Staphylococcus aureus antigens and challenges in vaccine development*. Expert Rev. Vaccines 7:805-815.
- Middleton, J.R.; Luby, C.D. y Scott Adams, D. (2009) *Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data*. Vet. Microbiol. 1:2192-2198.
- Middleton, J.R.; Ma, J.; Rinehart, C.L.; Taylor, V.N.; Luby, C.D. y Steevens, B.J. (2006) *Efficacy of different Lysin™ formulations in the prevention of Staphylococcus aureus intramammary infection in dairy heifers*. J. Dairy Res. 73:10-19.
- Mocellin, S., Marincola, F.; Rossi, C.R.; Nitti, D. y Lise, M. (2004) *The multifaceted relationship*

*between IL-10 and adaptive immunity: Putting together the pieces of a puzzle.* Cytokine Growth Factor Rev. 15:61-76.

- Mongodiem, E.; Bajolet, O.; Cutrona, J.; Bonnet, N.; Dupuit, F.; Puchelle, O. y Benzman, S. (2002) *Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus are involved in adherence to human airway epithelium.* Infect. Immun. 70:620-630.
- Moore, K. W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R. L. y O'Garra, A. (2001) *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu. Rev. Immunol. 19:683-765.
- Morein, B. y Bengtsson, K.L. (1999) *Immunomodulation by iscoms, immune stimulating complexes.* Methods 19:94-102.
- Morein, B.; Blomqvist, G. y Hu, K. (2007a) *Immune responsiveness in the neonatal period.* J. Comp. Pathol. 137:27-31.
- Morein, B.; Hu, K.F. y Abusugra, I. (2004) *Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine.* Adv. Drug Deliver. Rev. 56:1367-1382.
- Morein, B.; Lövgren-Bengtsson, K.; D'Hondt, E. y Hu, K.F. (2007b) *New ISCOMS meet unsettled vaccine demands in vaccine adjuvants and delivery systems.* En: Manmohan Sing (Ed), *Vaccine adjuvants and delivery systems.* John Wiley & Sons, Inc, p. 191-222.
- Morein, B.; Sundquist, B.; Höglund, S. Dalsgaard, K. y Osterhaus, A. (1984) *Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses.* Nature 308:457-460.
- Morelli, A.B.; Becher, D.; Koernig, S.; Silva, A.; Drane, D. y Maraskovsky, E. (2012) *ISCOMATRIX: a novel adjuvant for use in prophylactic and therapeutic vaccines against infectious diseases.* J. Med. Microbiol. 61:935-943.
- Myllys, V. y Rautala, H. (1995) *Characterization of clinical mastitis in primiparous heifers.* J. Dairy Sci. 78:538-545.
- Myllys, V.; Honkanen-Buzalski, T.; Virtanen, H.; Pyörälä, S. y Müller, H.P. (1994) *Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis.* J. Dairy Sci. 77:446-452.
- Nanra, J.S.; Timofeyeva, Y.; Buitrago, S.M.; Sellman, B.R.; Dilts, D.A.; Fink, P.; Nunez, L.; Hagen, M.; Matsuka, Y.V.; Mininni, T.; Zhu, D.; Pavliak, V.; Green, B.A.; Jansen, K.U. y Anderson, A.S. (2009) *Heterogeneous in vivo expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by Staphylococcus aureus: implications for vaccine design.* Vaccine 27:3276-3280.
- National Mastitis Council (1996) *Current Concepts in Bovine Mastitis.* National Mastitis Council, Madison, Wisconsin, EE.UU.
- Neave, F.K.; Dodd, F.H.; Kingwill, R.G. y Westgarth, D.R. (1969) *Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management.* J. Dairy Sci. 52:696-707.
- Nelson, L.; Flock, J.I.; Höök, M.; Lindberg, M.; Müller, H.P. y Wädstrom, T. (1991) *Adhesins in staphylococcal mastitis as vaccine components.* Flem. Vet. J. 62:111-115.
- Ní Eidhin, D.; Perkins, S.; Francois, P.; Vaudaux, P.; Höök, M. y Foster, T.J. (1998) *Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of Staphylococcus aureus.* Mol. Microbiol. 30:245-257.

- Nickerson, S. C.; Owens, W.E.; Tomita, G.M. y Widel, P.W. (1999) *Vaccinating dairy heifers with a Staphylococcus aureus bacterin reduces mastitis at calving*. Large Anim. Pract. 20:16-28.
- Nickerson, S.C. (1985) *Immune mechanisms of the bovine udder: an overview*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 187:41-45.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E. y Boddie, R.L. (1995) *Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control*. J. Dairy Sci. 78:1607-1618.
- Nickerson, S.C.; Owens, W.E. y 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. 76:1290-1297.
- Nonnecke, B.J. y Harp, J.A. (1989) *Function and regulation of lymphocyte-mediated immune responses: relevance to bovine mastitis*. J. Dairy Sci. 72:1313-1327.
- Nonnecke, B.J.; Elsken, L.A. y Kehrl, M.E. Jr. (1986) *Local and systemic immune response in the cow after intramammary vaccination during lactation*. Vet. Immunol. Immunopathol. 11:31-44.
- Nordhaug, M.L.; Nesse, L.L.; Norcross, N.L. y Gudding, R. (1994a) *A field trial with an experimental vaccine against Staphylococcus aureus mastitis in cattle. 1. Clinical parameters*. J. Dairy Sci. 77:1267-1275.
- Nordhaug, M.L.; Nesse, L.L.; Norcross, N.L. y Gudding, R. (1994b) *A field trial with an experimental vaccine against Staphylococcus aureus mastitis in cattle. 2. Antibody response*. J. Dairy Sci. 77:1276-1284.
- Nour El-Din, A.N.; Shkreta, L.; Talbot, B.G.; Diarra, M.S. y Lacasse, P. (2006) *DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of Staphylococcus aureus*. Vaccine 24:1997-2006.
- Novick, R.P. (2003) *Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence*. Mol. Microbiol. 48:1429-1449.
- O'Hagan, D.T. (2004) *Recent developments in vaccine delivery systems*. En: *New generation Vaccines. 2<sup>nd</sup> ED.* (Eds.: Levine, M.M.; Kaper, J.B.; Rappuoli, R.; Liu, M. y Good, M.F.) Marcel dekker, Nueva York, p. 259-270.
- O'Brien, C.N.; Guidry, A.J.; Douglass, L.W. y Westhoff, D.C. (2001) *Immunization with Staphylococcus aureus lysate incorporated into microspheres*. J. Dairy Sci. 84:1791-1799.
- Oliver, S.P. y Sordillo, L.M. (1989) *Approaches to the manipulation of mammary involution*. J. Dairy Sci. 72:1647-1664.
- Oliver, S.P.; Gonzalez, R.N.; Hogan, J.S.; Jayarao, B.M. y Owens, W.E. (2004) *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality; 4<sup>th</sup> edition*. National Mastitis Council, Verona, Wisconsin, EE.UU.
- O'Riordan, K. y Lee, J.C. (2004) *Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Clin. Microbiol. Rev. 17:218-234.
- Ote, I.; Taminiau, B.; Duprez, J.N.; Dizier, I. y Mainil, J.G. (2011) *Genotypic characterization by polymerase chain reaction of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis*. Vet. Microbiol. 153:285-292.

- Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcón, J.J.; Cajero-Juárez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J.E.; Bravo-Patiño, A. y Baizabal-Aguirre, V.M. (2007) *Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis*. J. Infect. 54:399-409.
- Paape, M.; Mehrzad, J.; Zhao, X.; Detilleux, J. y Burvenich, C. (2002) *Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes*. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 7:109-121.
- Paape, M.J.; Bannerman, D.D.; Zhao, X. y Lee, J.W. (2003) *The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk*. Vet. Res. 34:597-627.
- Paape, M.J.; Shafer-Weaver, K.; Capuco, A.V.; Van Oostveldt, K. y Burnevich, C. (2000) *Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells*. Adv. Exp. Med. Biol. 480:259-277.
- Papadopoulou, G.; Karagouni, E. y Dotsika, E. (1998) *ISCOMs vaccine against experimental leishmaniasis*. Vaccine 16:885-892.
- Pappé, M.J.; Miller, R.H.; Young, M.D. y Peters, R.R. (1992) *Influence of involution on intramammary phagocytic defense mechanisms*. J. Dairy Sci. 75:1849-1856.
- Park, H.M.; Yoo, H.S.; Oh, T.H.; Kim, D. y Han, H.R. (1999) *Immunogenicity of alpha-toxin, capsular polysaccharide (CPS) and recombinant fibronectin-binding protein (r-FnBP) of Staphylococcus aureus in rabbit*. J Vet Med Sci. 61:995-1000.
- Park, Y.H.; Fox, L.K.; Hamilton, M.J. y Davis, W.C. (1993) *Suppression of proliferative responses of BoCD4C T lymphocytes by activated BoCD8C T lymphocytes in the mammary gland of cows with Staphylococcus aureus mastitis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 36:137-151.
- Pashine, A.; Valiante, N.M. y Ulmer, J.B. (2005) *Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants*. Nat. Med. 11:S63-S68.
- Paulrud, C.O. (2005) *Basic concepts of the bovine teat canal*. Vet. Res. Commun. 29:215-245.
- Pearce, M.J. y Drane, D. (2004) *ISCOMATRIX adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses*. Vaccine 22:2391-2395.
- Pearce, M.J. y Drane, D. (2005) *ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 57:465-474.
- Pellegrino, M.; Giraud, J.; Raspanti, C.; Odierno, L. y Bogni, C. (2010) *Efficacy of immunization against bovine mastitis using a Staphylococcus aureus avirulent mutant vaccine*. Vaccine 28:4523-4528.
- Pereira, U.P.; Oliveira, D.G.S.; Mesquita, L.R.; Costa, G.M. y Pereira, L.J. (2011) *Efficacy of Staphylococcus aureus vaccines for bovine mastitis: A systematic review*. Vet. Microbiol. 148:117-124.
- Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W. y Dempfle, L. (2002) *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res. 30:e36.
- Plattner, B.L. y Hostetter, J.M. (2011) *Comparative gamma delta T cell immunology: a focus on mycobacterial disease in cattle*. Vet. Med. Int. 2011:214384.
- Poutrel, B. ; Boutonnier, A.; Sutra, L. y Fournier, J.M. (1988) *Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among Staphylococcus aureus isolates from cow, goat, and ewe milk*. J. Clin. Microbiol. 26:38-40.

- Poutrel, B.; Gilbert, F.B. y Lebrun, M. (1995) *Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine Staphylococcus aureus strains*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2:166-171.
- Prenafeta, A.; March, R.; Foix, A.; Casals, I. y 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.
- Projan, S.J.; Kornblum, J.; Kreiswirth, B.; Moghazeh, S.L.; Eisner, W. y Novick, R.P. (1989) *Nucleotide sequence: the beta-hemolysin gene of Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res. 17:3305.
- Pujato, N.; Carrere, X.; Camussone, C.; Calvinho, L. y Marcipar, I. (2011) *Obtención de antígenos recombinantes de Staphylococcus aureus y su evaluación como inmunógenos para la formulación de una vacuna multicomponente*. IV Jornadas de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 1 y 2 de diciembre de 2011, p 89.
- Rafaelli, J.M. (2009) *Desarrollo de un antígeno potencialmente inmunogénico para la prevención de la mastitis bovina por Staphylococcus aureus*. Tesina de grado. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL.
- Rainard, P. y Boulard, C. (1992) *Opsonization of Streptococcus agalactiae of bovine origin by complement and antibodies against Group B polysaccharide*. Infect. Immun. 60:4801-4808.
- Rainard, P. y Poutrel, B. (1995) *Deposition of complement components on Streptococcus agalactiae in bovine milk in the absence of inflammation*. Infect. Immun. 63:3422-3427.
- Rainard, P. y Riollet, C. (2006) *Innate immunity of the bovine mammary gland*. Vet. Res. 37:369-400.
- Rambeaud, M.; Almeida, R.A.; Pighetti, J.M. y Oliver, S.P. (2003) *Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced Streptococcus uberis mastitis*. Vet. Immunol. Immunopathol. 96:193-205.
- Reinoso, E.B.; El-Sayed, A.; Lämmler, C.; Bogni, C. y Zschöck, M. (2008) *Genotyping of Staphylococcus aureus isolates from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina*. Microbiol. Res. 163:314-322.
- Rice, K.; Huesca, M.; Vaz, D. y McGavin, M.J. (2001) *Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in Staphylococcus aureus: identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant S. aureus*. Infect. Immun. 69:3791-3799.
- Riollet, C.; Rainard, P. y Poutrel, B. (2000a) *Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:161-167.
- Riollet, C.; Rainard, P. y Poutrel, B. (2000b) *Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with Staphylococcus aureus alpha-toxin*. Inflamm. Res. 49:486-496.

- Riolet, C.; Rainard, P. y Poutrel, B. (2001) *Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic Staphylococcus aureus infection*. J. Dairy Sci. 84:1077-1084.
- Riskey, A.L.; Loughman, A.; Cywes-Bentley, C.; Foster, T.J. y Lee, J.C. (2007) *Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of Staphylococcus aureus to fibrinogen and platelets*. J Infect Dis. 196:919-927.
- Roberson J. (1999) *The Epidemiology of Staphylococcus aureus on Dairy Farms*. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. p. 38.
- Robson, N.C.; Beacock-Sharp, H.; Donachie, A.M. y Mowat, A.M. (2003) *The role of antigen-presenting cells and interleukin-12 in the priming of antigen-specific CD4+T cells by immune stimulating complexes*. Immunology 110:95-104
- Rozalska, B. y Wadström, T. (1992) *Interaction of fibronectin and fibronectin binding protein (FnBP) of Staphylococcus aureus with murine phagocytes and lymphocytes*. FEMS Microbiol. Immunol. 4:305-315.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup>. ed*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
- Saran, A. y Chaffer, M. (2000) *Mastitis y calidad de leche*. Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina.
- Saravia-Otten, P.; Müller, H.P. y Arvidson, S. (1997) *Transcription of Staphylococcus aureus fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism*. J. Bacteriol. 179:5259-5263.
- Schanbacher, F.L.; Goodman, R.E. y Talhouk, R.S. (1993) *Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins*. J. Dairy Sci. 76:3812-3831.
- Schennings, T.; Heimdahl, A.; Coster, K. y Flock, J.I. (1993) *Immunization with fibronectin binding protein from Staphylococcus aureus protects against experimental endocarditis in rats*. Microb. Pathog. 15:227-236.
- Schoenborn, J. R. y Wilson, C.B. (2007) *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv. Immunol. 96:41-101.
- Schroder, K.; Hertzog, P.J.; Ravasi, T. y Hume, D.A. (2004) *Interferon- gamma: An overview of signals, mechanisms and functions*. J. Leukoc. Biol. 75:163-189.
- Screpanti, V.; Wallin, R.P.; Grandien, A. y Ljunggren, H.G. (2005) *Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells*. Mol. Immunol. 42:495-499.
- Shafer-Weaver, K.A. y Sordillo, L.M. (1997) *Bovine CD8C suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period*. Vet. Immunol. Immunopathol. 56:53-64.
- Shafer-Weaver, K. y Sordillo, L.M. (1996) *Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period*. J. Dairy Sci. 79:1347-1352.
- Shafer-Weaver, K.A.; Corl, C.M. y Sordillo, L.M. (1999) *Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period*. J. Dairy Sci. 82:1696-1706.
- Shalm, O.W.; Carroll, E.J. y Jain, N.C. (1971) *Bovine Mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, EE.UU.

- Shkreta, L.; Talbot, B.G.; Diarra, M.S. y Lacasse, P. (2004) *Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against Staphylococcus aureus induced mastitis in dairy cows*. *Vaccine* 23:114-126.
- Shompole, S.; Henon, K.T.; Liou, L.E.; Dziewanowska, K.; Bohach, G.A. y Bayles, K.W. (2003) *Biphasic intracellular expression of Staphylococcus aureus virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing*. *Mol. Microbiol.* 49:919-927.
- Shuster, D. E.; Kehrli M.E. Jr., Rainard, P. y Paape, M. (1997) *Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65:3286-3292.
- Signäs, C.; Raucci, G.; Jönsson, K.; Lindgren, P.E.; Anantharamaiah, G.M.; Höök, M. y Lindberg, M. (1989) *Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from Staphylococcus aureus: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86:699-703.
- Simpson, R.J. (2010) *Stabilization of proteins for storage*. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010:pdb.top79.
- Sinha, B. y Fraunholz, M. (2010) *Staphylococcus aureus host cell invasion and post-invasion events*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:170-175.
- Sinha, B. y Herrmann, M. (2005) *Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* 94:266-277.
- Sjölander, A.; Cox, J.C. y Barr, I.G. (1998) *ISCOMs: an adjuvant with multiple functions*. *J. Leukoc. Biol.* 64:713-723.
- Sjölander, A.; Drane, D.; Maraskovsky, E.; Scheerlinck, J.P.; Suhrbier, A.; Tennent, J. y Pearse M. (2001) *Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models*. *Vaccine* 19:2661-2665.
- Sjölander, A.; Van't Land, B. y Lövgren Bengtsson, K. (1997) *Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses*. *Cell Immunol.* 177:69-76.
- Skyberg, J.A.; Thornburg, T.; Rollins, M.; Huarte, E.; Jutila, M.A. y Pascual, D.W. (2011) *Murine and bovine  $\gamma\delta$  T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections*. *PLoS One* 6:e21978.
- Smith, K.L.; Hogan, J.S. y Todhunter, D.A. (1990) *A method for estimating confidence in the microbiological diagnosis of intramammary infection*. In: *Proceedings Natl. Mastitis Council.* 29:76-79.
- Smith, K.L. y Hogan, J.S. (2001) *The world of mastitis*. *Proc. 2nd Intern. Symp. Mastitis and Milk Quality*. Vancouver, British Columbia, Canada. p. 1-12.
- Smith, R.E.; Donachie, A.M.; Grdic, D.; Lycke, N. y Mowat, A.M. (1999) *Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses*. *J. Immunol.* 162:5536-5546.
- Soltys, J. y Quinn, M.T. (1999) *Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during Staphylococcal and Streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression*. *Infect. Immun.* 67:6293-6302.
- Sompolinsky, D.; Samra, Z.; Karakawa, W.W.; Vann, W.F.; Schneerson, R. y Malik, Z. (1985) *Encapsulation and capsular types in isolates of Staphylococcus aureus from different sources and relationship to phage types*. *J. Clin. Microbiol.* 22:828-834.

- Sordelli, D.O.; Buzzola, F.R.; Gomez, M.I.; Steele-Moore, L.; Berg, D.; Gentilini, E.; Catalano, M.; Reitz, A.J.; Tollersrud, T.; Denamiel, G.; Jeric, P. y Lee, J.C. (2000) *Capsule expression by bovine isolates of Staphylococcus aureus from Argentina: genetic and epidemiologic analyses*. J. Clin. Microbiol. 38:846-850.
- Sordillo, L.M. y Streicher, K.L. (2002) *Mammary gland immunity and mastitis susceptibility*. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 7:135-146.
- Sordillo, L.M.; Shafer-Weaver, K. y De Rosa, D. (1997) *Immunobiology of the mammary gland*. J. Dairy Sci. 80:1851-1865.
- Stelwagen, K.; Carpenter, E.; Haigh, B.; Hodgkinson, A. y Wheeler, T.T. (2009) *Immune components of bovine colostrum and milk*. J. Anim. Sci. 87:3-9.
- Sun, H.X.; Xie, Y. y Ye, Y.P. (2009) *ISCOMs and ISCOMATRIX*. Vaccine 27:4388-4401.
- Sutra, L. y Poutrel, B. (1994) *Factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 40:79-89.
- Sutra, L.; Rainard, P. y Poutrel, B. (1990) *Phagocytosis of mastitis isolates of Staphylococcus aureus and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk*. J. Clin. Microbiol. 28:2253-2258.
- Taylor, B.C.; Dellinger, J.D.; Cullor, J.S. y Scott, J.L. (1994) *Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8C*. Cell. Immunol. 156:245-253.
- Tollersrud, T.; Kenny, K.; Reitz, A.J. y Lee, J.C. (2000) *Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of Staphylococcus aureus and other Staphylococcus spp. From Europe and the United States*. J. Clin. Microbiol. 38:2998-3003.
- Tollersrud, T.; Zernichow, L.; Andersen, S.R.; Kenny, K. y Lund, A. (2001) *Staphylococcus aureus capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle*. Vaccine 19:3896-3903.
- Trinchieri, G. (1995) *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. Annu. Rev. Immunol. 13:251-276.
- Trinchieri, G. (2003) *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat. Rev. Immunol. 3:133-146.
- Tuchscher, L.; Löffler, B.; Buzzola, F.R. y Sordelli, D.O. (2010) *Staphylococcus aureus adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression*. Future Microbiol. 5:1823-1832.
- Tuchscher, L.P.; Buzzola, F.R.; Alvarez, L.P.; Lee, J.C. y Sordelli, D.O. (2008) *Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of Staphylococcus aureus in mice*. Infect. Immun. 76:5738-5744.
- Van Kampen, C. y Mallard, B.A. (1997) *Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets*. Vet. Immunol. Immunopathol. 59:79-91.
- Verdier, I.; Durand, G.; Bes, M.; Taylor, K.; Lina, G.; Vandenesch, F.; Fattom, A. y Etienne, J. (2007) *Identification of the capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus clinical isolates by PCR and*

*agglutination tests*. J. Clin. Microbiol. 45:725-729.

- Vivier, E. y Malissen, B. (2005) *Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited*. Nat. Immunol. 6:17-21.
- Waage, S.; Skei, H.R.; Rise, J.; Rogdo, T.; Sviland, S. y Odegaard, S.A. (2000) *Outcome of clinical mastitis in dairy heifers assessed by reexamination of cases one month after treatment*. J. Dairy Sci. 83:70-76.
- Wadström, T. y Möllby, R. (1971) *Studies on extracellular proteins from Staphylococcus aureus. VI. Production and purification of  $\beta$ -haemolysin in large scale*. Biochim. Biophys. Acta 242:288-307.
- Wallemacq, H.; Bedoret, D.; Pujol, J.; Desmet, C.; Drion, P.V.; Farnir, F.; Mainil, J.; Lekeux, P.; Bureau, F. y Fiévez, L. (2012) *CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed Staphylococcus aureus immunization in mice: a new vaccine strategy for staphylococcal mastitis*. Vaccine 30:2116-2124.
- Watson, D.L. (1992) *Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers*. Res. Vet. Sci. 53:346-353.
- Weiss, D.L. y Brown, M.A. (2001) *Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression*. Immunol. Rev. 179:35-47.
- Wilschut, J. (2009) *Influenza vaccines: the virosome concept*. Immunol. Lett. 122:118-121.
- Yancey, R.J. Jr. (1999) *Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction*. Adv. Vet. Med. 41:257-273.
- Zecconi, A.; Calvinho, L.F. y Fox, K.L. (2006) *Staphylococcus aureus intramammary infections*. IDF Bulletin 408:1-36.
- Zetterlund, A.; Larsson, P.H.; Müller-Suur, C.; Palmberg, L. y Larsson, K. (1998) *Budesonide but not terbutaline decreases phagocytosis in alveolar macrophages*. Respir. Med. 92:162-166.
- Zhang, G.; Young, J.R.; Tregaskes, C.A.; Sopp, P. y Howard, C.J. (1995) *Identification of a novel class of mammalian Fc gamma receptor*. J. Immunol. 155:1534-1541.
- Zhao, X. y Lacasse, P. (2008) *Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control*. J. Anim. Sci. 86:57-65.
- Zhu, J.; Yamane, H. y Paul, W.E. (2010) *Differentiation of effector CD4 T cell populations*. Annu. Rev. Immunol. 28:445-489.

## APÉNDICE I: SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

### 1. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Tripteína Soya	Tripteína	1,7 % (p/v)
	Peptona de soya	0,3 % (p/v)
	NaCl	0,5 % (p/v)
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 % (p/v)
	Glucosa	0,25 % (p/v)
	pH	7,3
- Agar Base	Peptona	0,5 % (p/v)
	Tripteína	1 % (p/v)
	Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
	Extracto de corazón	0,3 % (p/v)
	Almidón	0,1 % (p/v)
	NaCl	0,5 % (p/v)
	Agar - agar	1,5 % (p/v)
- Agar Sangre	Agar Base	
	Sangre bovina	5 % (v/v)
- Agar Salado	Agar Base	
	NaCl	2,5 % (p/v)
- Medio Luria - Bertani (LB)	Peptona	1 % (p/v)
	Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
	NaCl	1 % (p/v)
	pH	7,3
- LB-agar	Medio LB	
	Agar-agar	2 % (p/v)

## 2. SOLUCIONES

### Soluciones de uso general

- PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
	pH	7,4
- PBS-Tween	PBS	
	Tween-20 (Sigma)	0,05 % (v/v)
- Solución de bloqueo	PBS	
	Leche de cabra descremada	5% (p/v)

### Tinción de Gram

- Cristal Violeta	Cristal Violeta	1 % (p/v)
- Lugol	Yodo en cristal	1% (p/v)
	Ioduro de K	2% (p/v)
- Decolorante	Alcohol 96%	66,6% (v/v)
	Acetona	33,3% (v/v)
- Safranina	Safranina	1%% (p/v)

### Ensayo de Opsonofagocitosis:

- FITC/NaCO <sub>3</sub>	Isotiocianato de Fluoresceína	
	(FITC) (Sigma)	0,1 mg/ml
	NaCO <sub>3</sub>	0,1 M
	pH	9
- Solución de fagocitosis	RPMI 1640 (Sigma)	
	MgSO <sub>4</sub>	0,6 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
	Albúmina sérica bovina	0,1 % (p/v)
	pH	7,2
- Solución de lisis	Cl(NH) <sub>4</sub>	150 mM
	KHCO <sub>3</sub>	1 mM

	EDTA	0,1 mM
	pH	7,2
- Azul de Tripán	PBS	
	Azul de Tripán	0,4 % (p/v)
- Solución de "stop"	NaCl	0,85%
	EDTA	0,04%
	pH	7,2
- PBS-BrEt	PBS	
	Bromuro de Etidio	5 mg/ml
- Solución de citometría	PBS	
	EDTA	0,5 mM
	Azida sódica	0,01 % (p/v)
	Albúmina sérica bovina (Sigma)	1 % (p/v)
	pH	7,2

#### Electroforesis en geles de agarosa

- Buffer de muestra 6X	Azul de Bromofenol	0,25 % (p/v)
	Glicerol	30 % (v/v)
- TAE	Tris-acetato pH 8	40 Mm
	EDTA	1 mM

#### Transformación de bacterias por técnica clásica

- Solución de transformación (ST) 1	Buffer Mops,	10 mM
	KCl	10 mM
	pH	pH 7
- ST2	Buffer Mops	100 mM
	KCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	50 mM
	pH	6,5

#### Purificación de proteínas en columna de pseudoafinidad a Níquel

- Solución de siembra	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	5 mM

- Solución de Lavado	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	20 mM
- Solución de <i>refolding</i> (SR) 1	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	5 mM
	Urea	3 M
- SR2	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	5 mM
	Urea	2 M
- SR3	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	5 mM
	Urea	1 M
- SR4	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	5 mM
	Urea	0,5 M
- Solución de elución (SE) 1	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	50 mM
- SE2	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	100 mM
- SE3	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM

	Imidazol	250 mM
- SE4	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	0,5 M
	B-mercaptoetanol	1 mM
	Imidazol	500 mM

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

- Gel de apilamiento	Tris - HCl pH 6.8	130 mM
	SDS	0,05 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	4.8 % (p/v)
	TEMED	0.1 % (v/v)
	Persulfato de amonio	0.05 % (p/v)
- Gel de separación	Tris - HCl pH 8,8	375 mM
	SDS	SDS 0.1 % (p/v)
	Acrilamida/Bisacrilamida (29:1)	15 % (p/v)
	Glicerol	10 % (v/v)
	TEMED	0.06 % (v/v)
	Persulfato de amonio	0.05 % (p/v)
- Buffer de muestra 4X	Tris-HCl pH 6,8	250 mM
	Glicerol	40 % (v/v)
	SDS	8 % (p/v)
	$\beta$ -mercaptoetanol	10 % (v/v)
	Azul de bromofenol	0.4 % (p/v)
- Buffer de corrida	Tris - HCl pH 8,3	25 mM
	Glicina	192 mM
	SDS	0.1 % (p/v)

#### Tinción de Coomassie

- Solución colorante	Azul de Coomassie G-250	0,5 % (p/v)
	Etanol	45 % (v/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)
- Solución decolorante I	Etanol	45 % (v/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)
- Solución decolorante II	Etanol	10 % (v/v)
	Ácido acético	10 % (v/v)

### Actividad hemolítica

- Solución diluyente de GR	PBS	
	Mg(SO) <sub>4</sub>	2 mM
	Albúmina sérica bovina	0,1%

### Western Blot:

- Buffer de transferencia	Tris - HCl pH 8,3	25 mM
	Glicina	192 mM
	Etanol	20% (v/v)
- Solución de equilibrado	PBS	
	DMSO (Merck)	1,5 % (v/v)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1 % (v/v)
	Diaminobezidina (Sigma)	0,05 % (p/v)

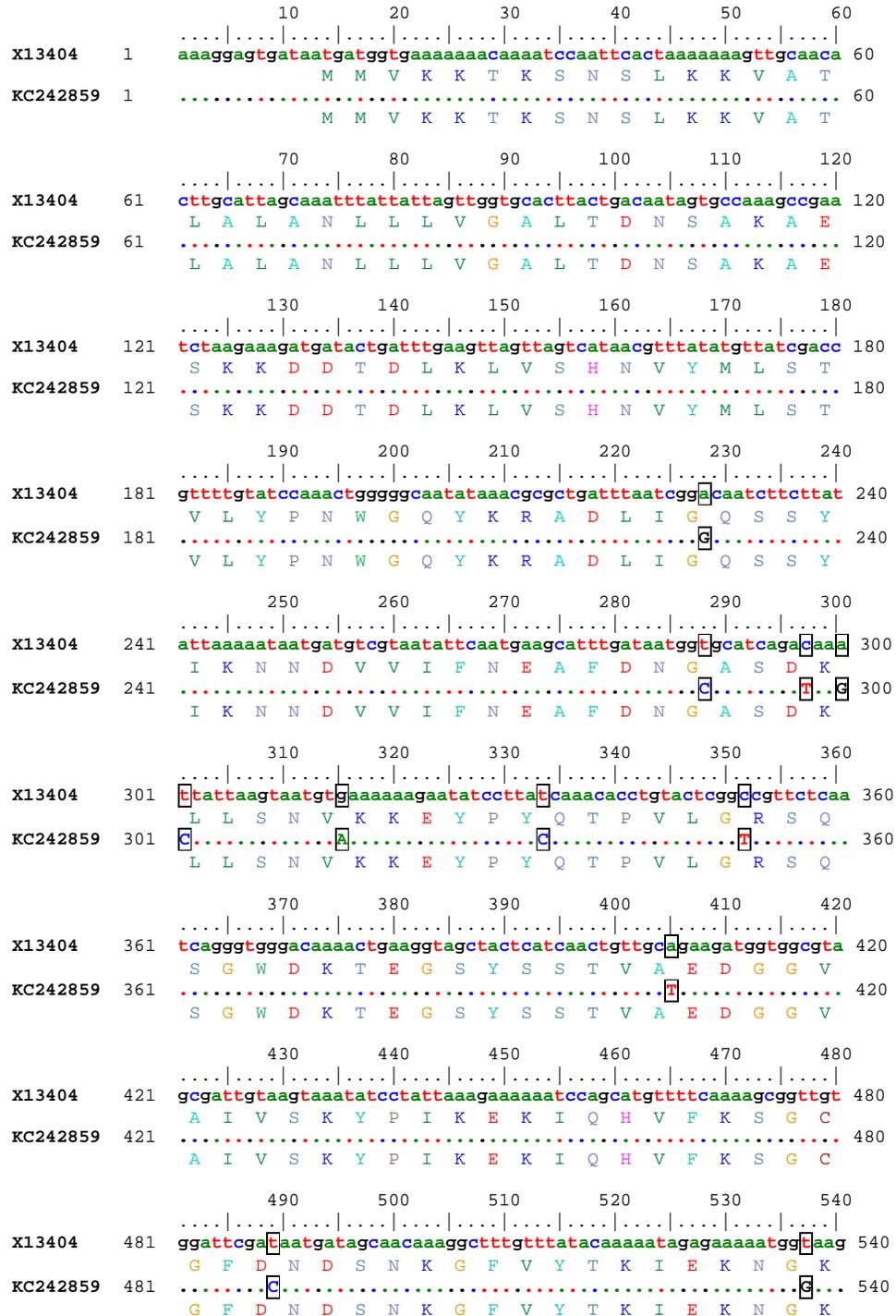
### Ensayos de internalización

- Medio de cultivo de células (MCC)	RPMI 1640 (Sigma)	40%
	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco)	40%
	Suero Fetal Bovino (Gibco)	10%
	L-Glutamina (Sigma)	2 mM
	Piruvato de Sódio (Sigma)	1 mM
	Buffer Hepes (Sigma)	40 mM
	Insulina bovina (Sigma)	5 µg/ml
	Hidrocortisona (Sigma)	1 µg/ml

### Linfoproliferación *in vitro*

- RPMI completo	RPMI 1640 (Sigma)	
	Suero fetal bovino (Gibco)	5 % (v/v)
	Penicilina (Gibco)	100 UI/ml
	Estreptomina (Gibco)	100 µg/ml,
	amphotericin B (Gibco)	0,25 µg/mL
	L- Glutamina (Sigma)	2 mM,
	Piruvato de Na (Sigma)	1 mM

**APÉNDICE II: ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE  $\beta$ -TOXINA PARA LA CEPA 226 (KC242859) Y LA SECUENCIA REPORTADA (Projan y col., 1989; X13404)**



		550	560	570	580	590	600	
X13404	541	aacgttca <b>g</b> ttatcgggtacacatacacaatctgaagattcacg <b>ttg</b> tggtgctggacat						600
		N V H V I G T H T Q S E D S R C G A G H						
KC242859	541	..... <b>H</b> .....						600
		N V H V I G T H T Q S E D S R C G A G H						
		610	620	630	640	650	660	
X13404	601	gatcga <sup>aaaa</sup> atttagagctgaac <sup>aaat</sup> gaaag <sup>aaat</sup> cagtg <b>act</b> tttg <sup>tt</sup> aaaaag <sup>aaaaat</sup>						660
		D R K I R A E Q M K E I S D F V K K K N						
KC242859	601	..... <b>H</b> .....						660
		D R K I R A E Q M K E I S D F V K K K N						
		670	680	690	700	710	720	
X13404	661	atccctaaagatgaaacgggtatatatagg <sup>tg</sup> ggcgac <b>ctta</b> atg <b>tc</b> aat <sup>aaagg</sup> actcca						720
		I P K D E T V Y I G G D L N V N K G G T P						
KC242859	661	..... <b>A</b> ..... <b>H</b> .....						720
		I P K D E T V Y I G G D L N V N K G G T P						
		730	740	750	760	770	780	
X13404	721	gagttcaagat <b>atg</b> ctt <sup>aaaa</sup> acttg <sup>aat</sup> g <sup>taaat</sup> gatg <b>ttc</b> tatatgcagg <b>tc</b> ataat						780
		E F K D M L K N L N V N D V L Y A G H N						
KC242859	721	..... <b>H</b> .....						780
		E F K D M L K N L N V N D V L Y A G H N						
		790	800	810	820	830	840	
X13404	781	agcacatgggac <b>cc</b> caatc <sup>aaatt</sup> caattg <sup>cgaaat</sup> ataatta <b>cc</b> ctaatgg <sup>taaac</sup> ca						840
		S T W D P Q S N S I A K Y N Y P N G K P						
KC242859	781	..... <b>H</b> .....						840
		S T W D P Q S N S I A K Y N Y P N G K P						
		850	860	870	880	890	900	
X13404	841	gaacatttagactat <b>at</b> attt <b>ac</b> agataaagatc <b>ata</b> aaaca <b>ac</b> caaaa <b>ca</b> attag <b>tc</b> aat						900
		E H L D Y I F T D K D H K Q P K Q L V N						
KC242859	841	..... <b>H</b> .....						900
		E H L D Y I F T D K D H K Q P K Q L V N						
		910	920	930	940	950	960	
X13404	901	gaagttgtgactg <sup>aaaa</sup> ac <b>ct</b> aag <b>cc</b> atgggatgtat <b>at</b> gcg <b>tt</b> cc <b>ca</b> tatt <b>act</b> acg <b>tt</b>						960
		E V V T E K P K P W D V Y A F P Y Y Y V						
KC242859	901	..... <b>H</b> .....						960
		E V V T E K P K P W D V Y A F P Y Y Y V						
		970	980	990	1000			
X13404	961	tacaatgatttttcagatcatt <b>ac</b> ccaatc <b>aa</b> ag <b>cc</b> tatag <b>ta</b> ata <b>g</b>				1008		
		Y N D F S D H Y P I K A Y S K *						
KC242859	961	..... <b>A</b> .....				1008		
		Y N D F S D H Y P I K A Y S K *						

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Luis Calvino por permitirme realizar mi tesis doctoral bajo su dirección. Durante estos años, no sólo me guió y acompañó en mi trabajo, sino que depositó en mí su confianza, dándome libertad para tomar decisiones, respetando mis opiniones, y permitiéndome, de este modo, crecer como profesional.

A mi co-director, Dr. Iván Marcipar, por los aportes y sugerencias realizados durante el desarrollo de este trabajo y la confección de este manuscrito.

A todo el grupo de investigación en mastitis INTA-UNL-CONICET. Un agradecimiento muy especial a la Dra. Carolina Veaute, quien colaboró con el diseño, realización e interpretación de los resultados de gran parte de las experiencias aquí presentadas. A la Lic. Nazarena Pujato, con quien compartimos el tema de investigación, y la Dra. Ma. Sol Renna, que colaboró con las experiencias con cultivos celulares. También a las Dras. Cristina Diez, Celina Baravalle y Bibiana Dallard, por su colaboración y sugerencias durante el desarrollo de mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Sanidad Animal de la EEA Rafaela, que siempre se mostraron dispuestos a colaborar conmigo en todo lo que necesité. Especialmente al Dr. Marcelo Signorini que colaboró en el análisis estadístico de los resultados, a la Med. Vet. Roxana Galarza que participó en los ensayos de inmunización, y a los Sres. Miguel Marín y Oscar Warnke que estuvieron a cargo de los muestreos de animales.

Quiero agradecer también al Dr. Ignacio Echaide y su equipo de trabajo del Laboratorio de Inmunología de la EEA Rafaela, especialmente a la Lic. Carolina Thompson, por permitirme el libre acceso a su laboratorio y por su constante predisposición de colaboración.

A los Dres. Hugo Ortega y Pablo Beldoménico de la FAVE UNL y sus respectivos grupos de trabajo, por permitirme realizar parte de mis experiencias en sus laboratorios.

A la Dra. Carina Porporato de la Universidad Nacional de Villa María que colaboró en la puesta a punto y realización de las citometrías de flujo.

Al grupo de trabajo del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología de la UNC que permitieron mi acceso a su laboratorio para las determinaciones por citometría de flujo.

A las Dras. Ma. Inés García y Adriana Soutullo de la FBCB UNL por su colaboración en la puesta a punto de los cultivos celulares.

Al director de la EEA Rafaela, Ing. Carlos Callaci, por avalar la realización de mi trabajo en dicha institución.

A la Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas de la UNL por permitirme realizar mi doctorado en su casa de estudios.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científico Técnicas que me otorgó las becas para la realización de mi posgrado.

A Ariel, por acompañarme incondicionalmente durante estos años, en el doctorado, y en la vida.