

Tesis de Posgrado

Inducción de inmunidad humoral y celular contra *Staphylococcus aureus* por inmunización local con una cepa viva atenuada y su rol en la prevención de las infecciones intramamarias

Gómez, Marisa Inés

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gómez, Marisa Inés. (2001). Inducción de inmunidad humoral y celular contra *Staphylococcus aureus* por inmunización local con una cepa viva atenuada y su rol en la prevención de las infecciones intramamarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3367_Gomez.pdf

Cita tipo Chicago:

Gómez, Marisa Inés. "Inducción de inmunidad humoral y celular contra *Staphylococcus aureus* por inmunización local con una cepa viva atenuada y su rol en la prevención de las infecciones intramamarias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3367_Gomez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Inducción de inmunidad humoral y celular contra *Staphylococcus aureus*
por inmunización local con una cepa viva atenuada
y su rol en la prevención de las infecciones intramamarias

Marisa Inés Gómez

Tesis presentada para optar al título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Daniel Oscar Sordelli

Director Asistente: Dra. Verónica Edith García

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires
Paraguay 2155, 1121, Buenos Aires - ARGENTINA

2001

03367

No 03367

A mis padres

A mi hermana

A Pablo

Agradezco al Dr. Daniel Sordelli, Director de este trabajo de Tesis, por permitirme realizar mi Tesis en el Departamento a su cargo, por su constante interés en mi formación científica y docente, por la enorme confianza que siempre depositó en mí y por todos los momentos compartidos a lo largo de estos años.

Agradezco a la Dra. Verónica García, Directora Asistente de este trabajo de Tesis, por haberme ayudado y guiado en mis primeros pasos en el camino de la investigación científica y por haber contribuido en mi formación profesional.

Agradezco al Dr. Norberto Sanjuan por su colaboración en los estudios histopatológicos desarrollados en este trabajo.

Agradezco a la Dra. Mónica Saraco y a la Bioq. Mabel Bibini por los buenos momentos compartidos junto al citómetro y por su desinteresada colaboración en la realización de este trabajo.

Agradezco a las Dras. M. Cristina Cerquetti, M. Magdalena Gherardi y Mariana Catalano por su incondicional y desinteresada ayuda en mi formación profesional y por todo el cariño que siempre me han demostrado.

Agradezco a la Sra. María Isabel Bernal por su apoyo técnico en la realización de gran parte de este trabajo y por el afecto que siempre me ha brindado.

Agradezco a la Dra. Fernanda Buzzola por su colaboración en la realización de este trabajo.

Agradezco también a Raul, Jorge, Karina y Regina por cuidar a mis ratoncitas durante estos años.

Agradezco a la Sra. Hilda por su buena predisposición y colaboración en la preparación de los materiales y por sus palabras cálidas de todos los días.

Agradezco a todos mis compañeros del piso 12 por los buenos momentos compartidos.

Agradezco asimismo a todos los Docentes, Tesistas y personal técnico y administrativo del Dpto. de Microbiología que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Agradezco asimismo a la Dra. Stella Maris González Cappa, Jefa anterior del Dpto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología, por permitirme la realización de mi trabajo de Tesis en el Departamento a su cargo.

El contenido de esta Tesis ha sido parcialmente publicado en:

García V.E., **Gómez M.I.**, Iglesias M.F., Sanjuan N., Gherardi M.M., Cerquetti M.C., Sordelli D.O. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus*: microbiological and immunological studies in a mouse mastitis model. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **14:45-51**, 1996.

Gómez M.I., García V.E., Gherardi M.M., Cerquetti M.C., Sordelli D.O. Intramammary immunization with live-attenuated *Staphylococcus aureus* protects mice from experimental mastitis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, **20:21-27**, 1998.

Gómez M.I., Sordelli D.O., Buzzola F.R., García V.E. Induction of cell-mediated immunity to *Staphylococcus aureus* in the mammary gland by local immunization with a live-attenuated mutant. Remitido para su publicación (Infect. Immun.).

Trabajos en colaboración realizados durante el Doctorado:

Sordelli D.O., Cerquetti M.C., Buzzola F.R., García V. E., **Gómez M.I.**, Morris Hooke A. Attenuated mutants of *Staphylococcus aureus* with two temperature-sensitive lesions: isolation and characterization. **Microbios. 94:95-102, 1998.**

Sordelli D.O., Buzzola F.R., **Gómez M.I.**, Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Catalano M., Reitz A.J., Tollersrud T., Denamiel G., Jeric P., Lee J.C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. **J. Clin. Microbiol. 38:846-850, 2000.**

Gherardi M.M., **Gómez M.I.**, Sordelli D.O., García V.E., Cerquetti M.C. *Salmonella enteritidis* temperature-sensitive mutants protect mice against challenge with virulent Salmonella strains of different serotypes. **FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29:81-88, 2000.**

Buzzola F.R., Quelle L., **Gómez M.I.**, Catalano M., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Denamiel G., Sordelli D. O. Genealogical evaluation of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. (En Prensa, Epidemiol. Infect.)

Luong T., Sau S., **Gómez M.I.**, Lee J.C., Lee C.Y. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide expression by *agr* and *sarA*. Remitido para su publicación (Infect. Immun.).

ABREVIATURAS

ADCC:	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos	h:	Hora(s)
ARNm:	Acido ribonucleico mensajero	IFN- γ :	Interferón γ
BALT:	Tejido linfoide asociado a los bronquios	IgA:	Inmunoglobulina A
BCG:	Bacilo de Calmette-Guerin	IgA-S:	Inmunoglobulina A secretoria
BSA:	Seroalbúmina bovina	IgG:	Inmunoglobulina G
CMH:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad	IgM:	Inmunoglobulina M
CnBP:	Proteína de unión a colágeno o receptor de Colágeno	IL:	Interleuquina
Con A:	Concanavalina A	<i>Ima</i> :	Intramamaria
CP:	Cápsula Polisacarídica	<i>ip</i> :	Intrapentoneal
CP5:	Cápsula Polisacarídica serotipo 5	LB:	Linfocitos B
CP8:	Cápsula Polisacarídica serotipo 8	LT:	Linfocitos T
cpm:	cuentas por minuto	LT $\gamma\delta$:	Linfocitos T con Receptor $\gamma\delta$
CSF:	Factor estimulante del crecimiento de colonias	LPMN:	Leucocitos Polimorfonucleares
CVA:	Cepa Viva Atenuada	μ l:	microlitros
DL ₅₀ :	Dosis Letal 50	mA:	miliAmpere
D.O.:	Densidad óptica	ml:	mililitros
EDTA:	Acido etiléndiamino tetracético	min.:	minutos
ELISA:	Enzimoinmunoensayo de adsorción	NALT:	Tejido linfoide asociado a la cavidad nasofaringea
exp:	Experimento	PBS:	"Buffer" salino fosfato
fMLP:	Formil-metionil-leucil- fenil alanina	PE:	Ficoeritrina
FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína	PP:	Placas de Peyer
FnBP:	Proteína de unión a Fibronectina o receptor de Fibronectina	PPD:	Derivado Proteico Purificado
Fig.:	Figura	PSA:	Persulfato dee amonio
g	Aceleración de la gravedad	SDS:	Dodesil sulfato de sodio
GALT:	Tejido linfoide asociado al intestino	SE:	Enterotoxina estafilocócica
G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos	SFB:	Sueron Fetal Bovino
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos	Spa:	Proteína A de <i>S. aureus</i>
		T $\gamma\delta$:	Linfocitos T con receptor $\gamma\delta$
		TC:	Tercer color
		TEMED:	Tetrametil-etiléndiamina
		TGF- α :	Factor de crecimiento transformante
		Th:	T colaboradoras
		TNF- α :	Factor de Necrosis Tumoral α
		<i>ts</i> :	Termosensible
		TSA:	Agar Tripteína de Soja
		TSB:	Caldo Tripteína de Soja
		TSST-1:	Toxina del Síndrome de Shock Tóxico
		μ Ci:	micro curie
		UFC:	Unidades Formadoras de Colonias

INDICE

1.	INTRODUCCION	1
1.1.	INMUNIDAD DE MUCOSAS: GENERALIDADES	2
1.1.1.	ANTICUERPOS EN LAS SECRECIONES	3
1.1.2.	INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS EN LAS MUCOSAS	4
1.2.	INFECCIONES INTRAMAMARIAS POR <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.3.	INMUNIDAD DE LA GLANDULA MAMARIA	5
1.3.1.	INMUNIDAD INNATA	5
1.3.1.1.	Mecanismos anatómicos de defensa	5
1.3.1.2.	Mecanismos solubles de defensa	6
1.3.1.3.	Mecanismos celulares de defensa	9
1.3.2.	INMUNIDAD ADAPTATIVA	12
1.3.3.	INMUNIDAD DE LA GLANDULA MAMARIA DURANTE EL PERIODO PERINATAL	14
1.4.	PATOGENESIS DE LAS INFECCIONES <i>Ima</i> POR <i>S. aureus</i>	16
1.4.1.	ENTRADA DE <i>S. aureus</i> A LA GLANDULA MAMARIA	16
1.4.2.	COLONIZACIÓN DE LA GLANDULA MAMARIA	16
1.4.2.1.	Rol de las adhesinas	16
1.4.2.2.	Expresión de factores antifagocíticos: proteína A y cápsula	17
1.4.3.	ALTERACIONES EN LA GLANDULA MAMARIA INFECTADA	19
1.4.3.1.	Rol de las citotoxinas de <i>S. aureus</i> en la infección <i>Ima</i>	21
1.4.3.2.	Rol de las enzimas extracelulares y coagulasa de <i>S. aureus</i> en la infección <i>Ima</i>	22
1.4.3.3.	Rol de los superantígenos producidos por <i>S. aureus</i> en la infección <i>Ima</i>	23
1.4.3.4.	Internalización de <i>S. aureus</i> en células fagocíticas y no fagocíticas: rol en la patogénesis de la infección <i>Ima</i>	24
1.5.	MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INFECCIONES <i>Ima</i>	25
1.6.	CONTROL DE LAS INFECCIONES <i>Ima</i> POR <i>S. aureus</i>	26
1.6.1.	PROFILAXIS CON ANTIBIOTICOS	26
1.6.2.	INMUNOREGULACION CON CITOQUINAS	26
1.7.	INMUNOPROFILAXIS DE LAS INFECCIONES <i>Ima</i>	27

1.7.1.	CEPAS BACTERIANAS ATENUADAS COMO INMUNOGENOS	31
1.7.2.	ruta de administracion del inmunogeno	32
1.8.	HIPOTESIS	34
1.9.	OBJETIVO GENERAL	35
1.10.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	35
2.	MATERIALES Y METODOS	37
2.1.	SOLUCIONES	38
2.2.	CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIGENOS	38
2.3.	RATONES	39
2.4.	OBTENCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DE CEPAS MUTANTES TERMOSENSIBLES DE <i>S. aureus</i>	40
2.4.1.	Mutagénesis química, enriquecimiento con antibióticos y aislamiento de mutantes termosensibles	40
2.4.2.	Frecuencia de reversión <i>in vitro</i>	40
2.4.3.	Obtención de proteínas totales y exoproductos de <i>S. aureus</i>	41
2.4.4.	Determinación de la concentración de proteínas	41
2.4.5.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	41
2.4.5.1	Tinción de los geles con Coomassie-blue	43
2.4.5.2.	Patrones de peso molecular	43
2.4.6.	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀)	43
2.4.7.	Evaluación inmunológica de la cepa A523 en un modelo de infección sistémica	43
2.5.	EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE LA CVA A523 DE OTORGAR PROTECCION EN LA GLANDULA MAMARIA E INDUCIR INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR	44
2.5.1.	Inoculación intramamaria <i>Ima</i>	44
2.5.2.	Recuperación de <i>S. aureus</i> a partir de homogenatos de la glándula mamaria	45
2.5.3.	Estudios inmunohistoquímicos	45
2.5.4.	Obtención de muestras de leche	46
2.5.5.	Recuperación de <i>S. aureus</i> a partir de muestras de leche	46
2.5.6.	Recuento de células somáticas en leche	46
2.5.7.	Determinación de anticuerpos en plasma y leche	46

2.5.8.	Obtención de células mononucleares	47
2.5.9.	Ensayos de proliferación <i>in vitro</i>	47
2.5.10.	Detección de antígenos de superficie	48
2.5.11.	Detección de citoquinas por ELISA	49
2.5.12.	Detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo	50
2.6.	CONSIDERACIONES ESTADISTICAS	51
3.	RESULTADOS	52
3.1.	MUTANTES de <i>S. aureus</i> ATENUADAS POR TERMOSENSIBILIDAD	53
3.1.1.	Obtención y caracterización de cepas termosensibles	53
3.1.2.	Frecuencia de reversión de las mutantes <i>ts</i>	54
3.1.3.	Caracterización del perfil de proteínas totales y exoproductos de la mutante <i>ts</i> A523	55
3.1.4.	Conclusiones parciales	56
3.2.	CARACTERIZACION DE LA MUTANTE <i>ts</i> A523 DE <i>S. aureus</i> EN UN MODELO MURINO DE INFECCION SISTEMICA	56
3.2.1	Atenuación de la cepa mutante <i>ts</i> A523	56
3.2.2.	Efecto de la inmunización <i>ip</i> con la CVA A523 sobre la generación de anticuerpos específicos en plasma	57
3.2.3.	Efecto de la inmunización <i>ip</i> con la CVA A523 en la protección frente al desafío con <i>S. aureus</i>	58
3.2.4.	Conclusiones parciales	58
3.3.	INFECCION INTRAMAMARIA EXPERIMENTAL POR <i>S. aureus</i> 8325 ϕ 11	59
3.3.1.	Estudios bacteriológicos	59
3.3.2.	Estudios histológicos	60
3.3.3.	Conclusiones parciales	67
3.4.	INOCUIDAD DE LA CVA A523 EN LA GLANDULA MAMARIA	67
3.4.1.	Permanencia de la CVA A523 en la glándula mamaria	67
3.4.2.	Efecto de la inoculación <i>Ima</i> con la CVA A523 sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas	70
3.4.3.	Conclusiones parciales	71
3.5.	EFFECTO DE LA INMUNIZACION <i>Ima</i> CON LA CVA A523 SOBRE LA DEPURACION DE <i>S. aureus</i> 8325-4 ϕ 11 DE LA GLANDULA MAMARIA	71
3.5.1.	Inmunización por la ruta local <i>Ima</i>	71

3.5.2.	Inmunización por la ruta sistémica <i>ip</i>	74
3.5.3.	Conclusiones parciales	75
3.6.	EFFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON LA CVA A523 EN LA INDUCCION DE INMUNIDAD HUMORAL	76
3.6.1.	Anticuerpos específicos en leche	76
3.6.2.	Anticuerpos específicos en plasma	78
3.6.3.	Caracterización de los anticuerpos inducidos por la inmunización <i>Ima</i>	79
3.6.4.	Conclusiones parciales	80
3.7.	EFFECTO DE LA INMUNIZACION LOCAL CON LA CVA A523 SOBRE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS PRESENTES EN GANGLIOS LINFATICOS DRENANTES DE GLANDULA MAMARIA	81
3.8.	EFFECTO DE LA INMUNIZACION <i>Ima</i> CON LA CVA A523EN LA INDUCCION DE INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS EN LA GLANDULA MAMARIA	86
3.8.1.	Respuesta proliferativa <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i>	86
3.8.2.	Poblaciones linfocitarias involucradas en la respuesta proliferativa <i>in vitro</i> frente al estímulo con <i>S. aureus</i>	91
3.8.2.1.	Expansión de LT $\gamma\delta$	91
3.8.2.2.	Expansión de células NK, LT CD4+ y LT CD8+	97
3.8.3.	Producción de citoquinas luego del estímulo <i>in vitro</i> con <i>S. aureus</i> .	97
3.8.4.	Conclusiones parciales	102
3.8.5.	Efecto de la inmunización <i>Ima</i> con la CVA A523 sobre la respuesta inmune mediada por células en la glándula mamaria durante la infección por <i>S. aureus</i>	103
3.8.6.	Conclusiones parciales	108
4.	DISCUSION	110
5.	CONCLUSIONES	125
6.	BIBLIOGRAFIA	129

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el agente causal de infecciones de importancia médica y veterinaria. Las infecciones por *S. aureus* suelen ser recurrentes o persistentes a pesar de la presencia de anticuerpos específicos circulantes y asociados a mucosas, y del uso de antibióticos a los cuales la bacteria es susceptible. Entre las infecciones persistentes que *S. aureus* puede ocasionar, la infección intramamaria (*Ima*) crónica constituye la patología infecciosa más prevalente de los bovinos destinados a la lechería. Hasta el presente, no se cuenta con una vacuna efectiva de uso práctico que permita prevenir las infecciones *Ima* estafilocócicas. La hipótesis de este trabajo de investigación postula que la administración de una vacuna viva atenuada por la ruta local *Ima* sería un método idóneo para inducir una respuesta inmune adaptativa efectiva en la glándula mamaria contra *S. aureus*. En el marco de esta hipótesis, el objetivo general de este trabajo de investigación es proveer conocimiento acerca de las respuestas inmunes, tanto humorales como celulares, que es necesario inducir en la glándula mamaria para prevenir las infecciones por *S. aureus*. Se obtuvo una cepa viva atenuada de *S. aureus* (CVA A523) por termosensibilidad, la cual se utilizó como cepa prototípica en los estudios de inmunidad de la glándula mamaria. Para demostrar la hipótesis propuesta se desarrolló un modelo de infección *Ima* por la cepa 8325-4 ϕ 11 de *S. aureus*. Las lesiones histológicas observadas concordaron con las descritas durante la mastitis bovina. La inmunización con la CVA A523, por la ruta local *Ima* durante la etapa final de la preñez, confirió protección en la glándula mamaria frente a la infección experimental. La protección se evidenció a través de una significativa reducción en el número de UFC remanentes en la glándula mamaria de los ratones inmunizados luego del desafío experimental con la cepa virulenta parental de *S. aureus*. La inmunización por la ruta sistémica intraperitoneal indujo la presencia de elevados niveles de IgG circulantes pero no otorgó protección frente al desafío *Ima*. La protección inducida mediante la inmunización *Ima* se correlacionó con la presencia de elevados niveles de IgA e IgG en leche así como también con la presencia de poblaciones de linfocitos T capaces de producir IFN- γ frente al estímulo *in vitro* o durante la infección *in vivo* por *S. aureus*. La presencia en forma conjunta de anticuerpos específicos y de linfocitos capaces de producir citoquinas de tipo Th1 inducidos por la inmunización local constituye una estrategia promisorio para prevenir el establecimiento de la infección *Ima* crónica por *S. aureus* en un huésped vacunado. Se requerirán futuros ensayos controlados de inmunización en bovinos con CVA para extender la validez de nuestros hallazgos a rumiantes destinados a la lechería.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus can cause a variety of infections relevant to humans and domestic animals of economic importance. *S. aureus* infections are usually persistent in spite of the presence of high levels of antibodies in blood and at mucosal surfaces and the use of antibiotics to which this pathogen is susceptible. Among the persistent infections that *S. aureus* can cause, the chronic intramammary (*Ima*) infection constitutes the most prevalent infectious disease of dairy ruminants. To the present, there is no useful vaccine available that provides significant protection from *Ima S. aureus* infection. The hypothesis of this investigation is that local *Ima* administration of a live-attenuated (*la*) vaccine may be used to induce an effective adaptive immune response in the mammary gland against *S. aureus*. The final goal of this study is to provide information for the better understanding of the appropriate immune responses, humoral and cell-mediated, that it is necessary to induce in the mammary gland to prevent *S. aureus* infections. A *la-S. aureus* strain (*la*-A523) with temperature-sensitive phenotype was obtained. This prototype strain was used as the immunogen in mammary gland immunity studies. To demonstrate the hypothesis, a mouse model of *Ima* infection by the *S. aureus* wild type (*wt*) strain was developed. The histopathological lesions observed were in agreement with those described in bovine mastitis. Local *Ima* immunization with *la*-A523 in the last week of pregnancy protected the mammary gland from experimental infection. Protection was determined as a significant decrease in the CFU numbers remaining in the mammary glands of immunized mice after challenge with the *wt-S. aureus* strain. Systemic intraperitoneal immunization induced the presence of high IgG levels in blood but did not confer protection against *Ima* challenge. The protection induced by *Ima* immunization was related to increased IgA and IgG levels in milk as well as lymphocyte populations able to produce IFN- γ during *in vitro* stimulation or *in vivo* *S. aureus* infection. The presence of both, specific antibodies and lymphocytes able to produce type 1 cytokines, induced by local immunization may constitute an effective strategy to prevent the establishment of chronic *Ima S. aureus* infection in a vaccinated host. Further controlled immunization trials in bovines with *la-S. aureus* will be required to extend the validity of these findings to dairy ruminants.



1. Introducción

1.1. INMUNIDAD DE MUCOSAS: GENERALIDADES

El estudio de la inmunidad de mucosas tiene una significativa relevancia dentro del campo de la inmunología, las enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas, debido a que la mayoría de las enfermedades causadas por microorganismos generalmente se inician a través de la invasión de una mucosa (99, 171).

Inmediatamente luego del nacimiento, las superficies mucosas son colonizadas por una gran variedad de bacterias y otros microorganismos, que están presentes en el aire inspirado, en los alimentos que ingerimos o en las excreciones fecales. La mayoría de estos microorganismos se establecen como la microflora autóctona o normal. Otras superficies mucosas, como el tracto respiratorio bajo, son normalmente estériles en un huésped sano (3). La adherencia es una interacción necesaria en la etapa inicial del proceso infeccioso y puede permitir la colonización de los tejidos e incluso la internalización de los microorganismos dentro de las células (4, 39). Durante el estado de buena salud, todas las superficies mucosas contienen importantes barreras contra la adhesión de bacterias patógenas. Pero cuando estas barreras se quiebran, los patógenos pueden rápidamente colonizar grandes áreas de las superficies mucosas y producir enfermedades infecciosas, ya sea mediante la invasión de los tejidos más profundos o por la secreción de toxinas que dañan tejidos locales y distantes (4).

Evidencias experimentales, tales como la aparición de anticuerpos específicos en las secreciones de glándulas no expuestas al antígeno, apoyan la existencia de un sistema inmune común asociado a las mucosas con características propias y separado del sistema inmune sistémico (21, 99, 171). El sistema inmune común de mucosas puede ser dividido anatómica y funcionalmente en sitios inductores y sitios efectores de la respuesta inmune, los cuales se encuentran conectados entre sí. En este sistema los linfocitos pueden ser sensibilizados en los sitios inductores tales como el tejido linfoide asociado al intestino, conocido como "GALT" (del inglés: Gut-Associated-Lymphoid-Tissue), el tejido linfoide asociado a los bronquios, conocido como "BALT" (del inglés: Bronchus-Associated-Lymphoid-Tissue), o el tejido linfoide

asociado a la cavidad nasofaríngea, conocido como NALT (del inglés: Nasal-Associated-Lymphoid-Tissue). Desde estos sitios los linfocitos efectores de la respuesta inmune y de memoria pueden migrar a sitios distantes tales como la lámina propia de la mucosa respiratoria, la mucosa intestinal y la mucosa genitourinaria o glándulas tales como la glándula mamaria, las glándulas salivales y las glándulas lacrimales (21, 98, 171).

1.1.1. ANTICUERPOS EN LAS SECRECIONES

La inmunoglobulina A de tipo secretorio (IgA-S) es el mayor agente protector de tipo humoral que encontramos en los fluidos que bañan las mucosas, previniendo la adherencia y penetración de los patógenos se adhieran y penetren (98). Los anticuerpos en las secreciones poseen características que los distinguen de los anticuerpos séricos. En las superficies mucosas del organismo, los anticuerpos son sintetizados localmente y son predominantemente de tipo IgA (96). Se ha propuesto que el cambio de isotipo ocurriría en los sitios inductores, mientras que la producción de la IgA por células plasmáticas tendría lugar en los sitios efectores del sistema común de mucosas (100). Estos procesos requieren señales específicas aportadas por moléculas coestimuladoras, citoquinas y linfocitos T (LT) colaboradores. Se ha propuesto que las citoquinas de tipo Th1 y Th2 no contribuirían significativamente a la conversión de los linfocitos B (LB) en plasmocitos secretores de IgA. Por el contrario, se ha propuesto que el Factor de Crecimiento Transformante tipo β (TGF- β) estaría involucrado en este proceso. A pesar que las citoquinas de tipo Th2 se han considerado tradicionalmente como los principales inductores de la secreción de anticuerpos, en la actualidad se demostró la contribución de respuestas tanto de tipo Th2 como Th1 sobre la producción de IgA. Al respecto, las citoquinas de tipo Th2 como la interleuquina (IL)-5 o la IL-6 participarían en la diferenciación terminal de los LB previamente diferenciados para secretar IgA, mientras que el interferón γ (IFN- γ) (citoquina de tipo Th1) estaría involucrado en la inducción del componente secretorio transmembrana necesario para el transporte de la IgA-S (82, 171).

1.1.2. INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS EN LAS MUCOSAS

La inmunidad mediada por células juega un rol importante en la protección de las mucosas. En este sentido, es importante destacar que las respuestas celulares se inducen más rápidamente que las respuestas humorales específicas por lo cual constituyen una primera línea de defensa contra los patógenos invasores. Se ha propuesto que la sensibilización de LT CD4+ podría ocurrir en los sitios inductores y luego los LT CD4+ activados podrían migrar hacia los sitios efectores del sistema común de mucosas. Por el contrario, no se conoce con exactitud la capacidad de migración de los LT CD8+ y se propone que la sensibilización de estas células ocurriría en los ganglios linfáticos regionales de los sitios efectores (171).

1.2. INFECCIONES INTRAMAMARIAS POR *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un comensal de la piel y las superficies mucosas. Sin embargo, la ruptura de alguna de estas barreras permite que esta bacteria se convierta en el agente causal de infecciones de importancia médica y veterinaria. En el hombre *S. aureus* aparece como patógeno oportunista en individuos de la comunidad u hospitalizados. Las infecciones asociadas a este microorganismo suelen ser recurrentes o persistentes a pesar de la presencia de anticuerpos específicos circulantes y asociados a mucosas, y del uso de antibióticos a los cuales la bacteria es susceptible. Los mecanismos que determinan dicha persistencia aún no han sido totalmente esclarecidos (17, 133). Entre las infecciones persistentes que *S. aureus* puede ocasionar, esta bacteria es la causa predominante de infecciones intramamarias (*Ima*) crónicas en rumiantes destinados a la lechería (116).

La mastitis infecciosa constituye la enfermedad más costosa de la industria láctea. Entre los perjuicios que genera esta infección, la disminución de la producción y calidad de la leche, así como el incremento de los costos veterinarios y la acumulación de animales por lesiones, infección crónica de la glándula mamaria, o la muerte del animal, son problemas de trascendental

importancia (184). Asimismo, esta enfermedad posee gran relevancia no sólo por su incidencia en la economía sino también por su incidencia en la salud pública, ya que la leche es una fuente de patógenos para el hombre o puede contener en algunos casos antibióticos residuales (116).

1.3. INMUNIDAD DE LA GLANDULA MAMARIA

La glándula mamaria, al igual que otras mucosas, forma un nexo biológico entre el organismo y el ambiente externo y constituye una importante ruta natural de entrada de potenciales patógenos (38). La glándula mamaria normal se encuentra protegida por una gran variedad de mecanismos de defensa, los cuales participan durante la inmunidad innata así como durante la respuesta inmune adaptativa. La inmunidad innata (o respuesta no específica) es el mecanismo de defensa predominante durante los primeros estadios de la infección y se encuentra mediada por factores anatómicos, solubles y celulares que actúan rápidamente luego del ingreso del microorganismo. Los mecanismos de defensa innata están seguidos, algunas horas más tarde, por la inducción de respuestas tempranas. Las respuestas tempranas no confieren inmunidad protectora a largo plazo pero ayudan a mantener la infección bajo control hasta que se induce la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune adaptativa o específica involucra el reconocimiento de determinantes específicos del patógeno facilitando su eliminación selectiva. Este proceso está mediado por anticuerpos específicos, células macrofágicas y poblaciones de células linfoides (72, 160).

1.3.1. INMUNIDAD INNATA

1.3.1.1. Mecanismos anatómicos de defensa

En los rumiantes el canal del pezón, considerado como la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores, actúa como una barrera mecánica contra las infecciones *Ima*. La parte terminal del pezón contiene músculos que lo mantienen cerrado entre los periodos de ordeño, limitando así la penetración de potenciales patógenos. El canal del pezón se encuentra recubierto con

queratina, un material céreo derivado del epitelio escamoso estratificado, que actúa como barrera física inhibiendo la progresión proximal de las bacterias invasoras (20, 24). La queratina adsorbe las bacterias y luego es descamada en el proceso de ordeño, eliminando así los microorganismos adsorbidos. El efecto de arrastre debido a los ordeños repetidos es uno de los mecanismos anti-bacterianos más importantes presente en la glándula mamaria. Asimismo, la queratina que recubre el canal del pezón posee ácidos grasos esterificados y no esterificados tales como ácido mirístico, ácido palmitoleico y ácido linoleico, que pueden ser bacteriostáticos para algunas bacterias (169).

1.3.1.2. Mecanismos solubles de defensa

La glándula mamaria posee componentes solubles no específicos que participan en la defensa contra los microorganismos. Estos componentes incluyen lactoferrina, lisozima, el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno y opsoninas.

La lactoferrina es una glicoproteína producida por células epiteliales y leucocitos, que puede ser secretada en la leche, saliva y secreciones nasales. La concentración de lactoferrina en la leche es baja en la glándula sana, pero aumenta durante la involución de la glándula y durante los procesos inflamatorios. Esta proteína posee la capacidad de secuestrar hierro en presencia de bicarbonato, resultando bacteriostática (inhibe el desarrollo) para bacterias con requerimientos de hierro tales como estafilococos y bacterias coliformes. La actividad bacteriostática de la lactoferrina puede inhibirse en presencia de citrato. Durante la lactancia los niveles de lactoferrina son bajos y los de citrato son altos, por lo cual la lactoferrina podría jugar un rol importante durante la defensa de la glándula mamaria en estado de involución (cuando las concentraciones de citrato son bajas) y no durante la lactancia (150). El secuestro de hierro por la lactoferrina previene además, la producción por parte de la bacteria de superóxido dismutasa, una enzima que inactiva los radicales superóxido, contribuyendo de esta forma a la acción bactericida de las células fagocíticas (150, 160).

La lisozima, una enzima que hidroliza el peptidoglicano de la pared celular, fue aislada de leche y se ha demostrado su capacidad de ejercer un efecto bacteriostático o bactericida sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas (136). Dado que la leche de los rumiantes contiene 300 veces menos lisozima que la leche humana, se ha sugerido que esta enzima podría proporcionar escasa defensa a la glándula mamaria bovina (28). Sin embargo, y a pesar de no haberse demostrado su acción *in vivo* durante la infección *Ima*, se ha observado un aumento en la concentración de lisozima durante la lactancia tardía y en leche de cuartos infectados (25, 90).

La enzima lactoperoxidasa, en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno, es bacteriostática para bacterias gram-positivas y bactericida para bacterias gram-negativas (121). Sin embargo, diversos factores pueden afectar la efectividad de este sistema en la glándula mamaria. En primer lugar, la enzima lactoperoxidasa es producida en bajas concentraciones por células epiteliales secretorias de la glándula mamaria. Los niveles de tiocianato en la glándula dependen de la dieta. Por último, el peróxido de hidrógeno en la glándula mamaria es generado por constituyentes enzimáticos de la leche y por bacterias del género *Streptococcus*, cuando están presentes. La enzima mieloperoxidasa producida por los neutrófilos cataliza la misma reacción que la enzima lactoperoxidasa. La baja tensión de oxígeno de la glándula mamaria puede inhibir la producción de peróxido de hidrógeno, limitando la actividad antimicrobiana de este sistema contra patógenos que causan infecciones *Ima* (160).

El sistema de complemento juega un rol fundamental en la defensa del huésped frente a *S. aureus* dado que provee opsoninas para que la bacteria pueda ser eficientemente fagocitada por macrófagos y neutrófilos (173). La activación de este sistema puede ocurrir por dos vías: la vía clásica o la vía alterna. La vía clásica se activa en presencia de anticuerpos que reaccionan con antígenos de la pared celular bacteriana. La vía alterna posee la misma acción antimicrobiana que la vía clásica, pero no requiere la presencia de anticuerpos específicos contra el microorganismo. La concentración de proteínas del sistema

de complemento es alta en calostro, durante la inflamación de la glándula y durante la involución de la misma. Por el contrario, las concentraciones son bajas durante la lactancia (107, 108, 132).

Los anticuerpos presentes en las secreciones de la glándula mamaria son sintetizados localmente o transportados selectivamente desde la circulación (16). Cuatro clases de inmunoglobulinas participan en la defensa de la glándula mamaria de los rumiantes contra las bacterias que causan mastitis: IgG₁, IgG₂, IgA e IgM (52, 110). La mayoría de la IgG₁ es transportada desde el plasma, mientras que la IgA y la IgM son producidas localmente. La IgG₂ puede tener ambos orígenes. La concentración de cada inmunoglobulina varía de acuerdo al período de la lactancia y al grado de infección de la glándula. En los rumiantes, la concentración de inmunoglobulinas en la glándula mamaria sana es baja durante la lactancia, aumentando lentamente durante los períodos de no lactancia y alcanzando el pico durante la calostrogénesis (155). Durante la inflamación de la glándula infectada se produce un aumento en la concentración de inmunoglobulinas que depende en gran medida del grado de permeabilidad del tejido secretorio. En secreciones de glándulas sanas el isotipo predominante es IgG₁, pero durante la respuesta inflamatoria, junto con la migración de neutrófilos al sitio de la infección puede ocurrir el pasaje de IgG₂. Se demostró que las inmunoglobulinas de tipo IgG₁, IgG₂ e IgM pueden actuar como opsoninas, contribuyendo así a la fagocitosis por neutrófilos (IgG₂ e IgM) y macrófagos (IgG₁). Estas inmunoglobulinas unidas a la superficie bacteriana, solas o en conjunto con el componente C3b del sistema de complemento, pueden ser reconocidas por las células fagocíticas (68). Por el contrario, la IgA no une proteínas del sistema de complemento ni actúa como opsonina pero contribuye a la aglutinación, previniendo la colonización bacteriana y neutralizando toxinas (110). Debido a la importancia de los anticuerpos locales en la defensa de la glándula mamaria contra patógenos, numerosos esfuerzos se han realizado para aumentar sus concentraciones en leche y suero mediante vacunación (160).

1.3.1.3. Mecanismos celulares de defensa

La actividad de las células residentes así como la de aquellas recientemente reclutadas durante los estadios tempranos de la infección juega un rol fundamental en la defensa de la glándula frente al desarrollo de las infecciones *Ima*. El recuento de células somáticas en leche (SSC: del inglés "Somatic Cell Count") incluye varios tipos celulares, tales como macrófagos, neutrófilos, linfocitos y un pequeño porcentaje de células epiteliales. En la glándula mamaria sana, el SCC total durante el período de lactancia es menor a 10^5 células/ml de leche. Durante las infecciones *Ima* bacterianas el SCC puede aumentar a más de 10^6 células/ml de leche en pocas horas (122, 129). Si las células inflamatorias son capaces de eliminar el estímulo, el reclutamiento de células cesa y el SCC retorna a niveles normales. Por el contrario, si el microorganismo es capaz de sobrevivir a la respuesta innata del huésped, la inflamación continúa resultando en la migración de células hacia el espacio alveolar (160).

Los macrófagos constituyen el tipo celular predominante en la glándula mamaria sana tanto durante la lactancia como en el período de involución y son responsables del proceso de reconocimiento y alarma celular en el tejido mamario (160). Durante el proceso de infección, cuando un microorganismo patógeno logra cruzar la barrera epitelial, es reconocido por los macrófagos presentes en el tejido conectivo subepitelial, con tres consecuencias importantes. La primera es la respuesta inmediata que comprende la fagocitosis y destrucción del patógeno por los macrófagos tisulares (72). El segundo efecto importante de la interacción de los macrófagos con los patógenos, es la secreción de citoquinas tales como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y Factor de Necrosis Tumoral tipo α (TNF- α) por parte de los macrófagos. Otros mediadores liberados por los macrófagos incluyen moléculas tales como prostaglandinas, óxido nítrico, leucotrienos y factor de activación plaquetaria. El efecto combinado de todos estos mediadores contribuye a la respuesta inflamatoria que se genera frente a la infección. Durante la respuesta inflamatoria, se produce un aumento en la permeabilidad vascular, lo cual conduce a la acumulación de inmunoglobulinas, proteínas del

sistema de complemento y otras proteínas séricas en el tejido inflamado. Existe además un cambio en la expresión de moléculas de adhesión del endotelio capilar lo cual permite la atracción de monocitos y neutrófilos hacia el sitio de la infección. Finalmente, como se describirá más adelante, los receptores presentes en los macrófagos poseen un rol adicional en la inducción de actividad co-estimuladora durante la respuesta inmune adaptativa (72).

Los neutrófilos son abundantes en la sangre, mientras que se encuentran ausentes en los tejidos normales. La respuesta inmune innata produce una variedad de factores que actúan como agentes quimiotácticos para los neutrófilos, permitiendo así que estas células sean reclutadas desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de la infección (72). Los neutrófilos son el tipo celular predominante en el tejido mamario y las secreciones mamarias durante la inflamación temprana y pueden constituir más del 90% del total de los leucocitos presentes. En el sitio de la infección, los neutrófilos son capaces de fagocitar bacterias en presencia o ausencia de anticuerpos específicos y pueden ejercer su efecto bactericida a través de mecanismos dependientes de O_2 o independientes del mismo, tales como peroxidasa, lisozima, enzimas hidrolíticas y lactoferrina (145, 160).

Diversos factores inherentes a la glándula mamaria dificultan la actividad de las células fagocíticas. Se ha descrito que la actividad bactericida y la fagocitosis de microorganismos por parte de macrófagos y neutrófilos de la glándula mamaria se encuentra disminuida debido a la fagocitosis indiscriminada de grasa, caseína y otros componentes de la leche. La actividad fagocítica de macrófagos y neutrófilos es más efectiva en presencia de opsoninas. Sin embargo, la presencia intermitente de proteínas del sistema de complemento en la leche, la escasa cantidad de inmunoglobulinas presentes en la glándula mamaria sana, sumado al predominio de anticuerpos de tipo IgG₁ (los cuales no contribuirían a la opsonización por neutrófilos), dificultan la adecuada erradicación de *S. aureus* durante la respuesta inflamatoria inducida en los primeros estadios de la infección (30, 160).

En relación con la respuesta inflamatoria temprana generada durante la infección de la glándula mamaria, cabe señalar además que diferentes patógenos establecen una relación huésped-bacteria diferente, que determina el desenlace de la infección. En el caso de las infecciones *Ima* por *Escherichia coli*, la respuesta inflamatoria es importante y se asocia a la erradicación del patógeno. Durante la infección por *S. aureus*, por el contrario, la bacteria persiste en la glándula dando lugar al establecimiento de una infección crónica. En un estudio reciente se han evaluado las respuestas tempranas generadas en la glándula mamaria por estos dos patógenos a fin de establecer algunas de las causas de la cronicidad de las infecciones por *S. aureus*. Se observó un reclutamiento moderado de neutrófilos durante la infección por *S. aureus* que correlacionó con la escasa producción de C5a y la ausencia de citoquinas inflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α e IL-8 en la glándula mamaria (137). Asimismo, en otro estudio se demostró que *S. aureus* produce al ser cultivado *in vitro* un factor extracelular que provoca una disminución en la expresión del receptor para C5a y del receptor para fMLP en la superficie de los neutrófilos. La producción de este factor *in vivo* podría ser determinante en la modulación de la quimiotaxis en el sitio de la infección (172).

Las células “natural killer”, o células NK, participan en las respuestas inmunes tempranas contra ciertas bacterias intracelulares y virus (72) y se ha sugerido que estas células podrían jugar un rol en la eliminación de bacterias de la glándula mamaria. Estas células pueden ejercer su función efectora mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpos, proceso conocido como ADCC (del inglés “Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity”), pero asimismo se ha demostrado su capacidad de inactivar bacterias gram-positivas y gram-negativas por un mecanismo extracelular (50). En investigaciones más recientes se demostró que células simil-NK aisladas de la glándula mamaria eran capaces de dar muerte a *S. aureus* si se las cultivaba en presencia de IL-2. Los mecanismos por los cuales las células simil-NK de la glándula mamaria bovina podrían tener una acción lítica sobre bacterias, así como su rol durante las infecciones *Ima*, no han sido aún dilucidados (160).

En la actualidad se propone además que la subpoblación de LT que poseen el receptor $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) jugaría un rol fundamental como primera línea de defensa contra los microorganismos, lo cual se ve reforzado por el predominio de este tipo celular en los epitelios epidérmico, gastrointestinal, respiratorio y vaginouterino (33, 42, 189). Sobre la base de la limitada diversidad de sus receptores antigénicos y su localización, se ha propuesto que los LT $\gamma\delta$ estarían involucrados en la inspección inmunológica de los epitelios que separan el ambiente del medio interno (33, 189). En este sentido, es importante destacar que la glándula mamaria es considerada un órgano epitelial en contacto con el ambiente externo y, durante la lactancia, la inmunidad local y el área superficial del epitelio se hallan incrementados en esta glándula. El predominio de LT $\gamma\delta$ en la glándula mamaria de los rumiantes y su significativa disminución en el período de mayor susceptibilidad para la infección sugerirían un rol potencial de los LT $\gamma\delta$ como primera línea de defensa contra las bacterias que causan mastitis (147, 148, 160).

1.3.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La generación de una respuesta inmune adaptativa involucra a las células presentadoras de antígeno y a los linfocitos. Además de su participación en la defensa inicial no específica de la glándula mamaria, los macrófagos participan en el procesamiento de antígenos y su presentación a los LT en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria. Los LT poseen un rol fundamental durante la respuesta inmune por su capacidad de reconocer antígenos con un alto grado de especificidad, de actuar como células efectoras y de regular la naturaleza y la intensidad de la respuesta inmune (72, 80). Durante la inducción de la respuesta inmune adaptativa en las mucosas, los LT vírgenes reconocen, en los ganglios linfáticos regionales, antígenos del microorganismo invasor que les son presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), produciéndose así la sensibilización y activación de los LT. En la actualidad se sabe que la exposición de LT CD4⁺ vírgenes a diferentes antígenos promueve su diferenciación en linfocitos Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 producen IFN- γ e IL-2 e inician los procesos de inmunidad celular, mientras que los

linfocitos Th2 secretan fundamentalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y conducen a la producción de anticuerpos. El estudio de las condiciones que llevan a una respuesta de tipo Th1 o Th2 es de gran interés ya que la erradicación efectiva de un microorganismo depende en gran medida del predominio de un tipo particular de LT CD4+. El establecimiento de una respuesta de tipo Th1 o Th2 se encuentra determinado por la naturaleza del antígeno, la ruta de infección o inmunización y por las citoquinas presentes en el microambiente de la respuesta inmune. La conversión al fenotipo Th1 es facilitada por IL-12 e IFN- γ , citoquinas que son producidas por macrófagos, células NK y LT $\gamma\delta$ durante las respuestas tempranas, mientras que la conversión al fenotipo Th2 es promovida por IL-4 (64, 142, 143).

La población de linfocitos en la leche de bovinos sanos está constituida principalmente por LT y escasos LB. Recientemente, se ha sugerido que la actividad de los LT sería de gran importancia en la protección de la glándula mamaria y en la depuración de agentes infecciosos (92). A diferencia de lo que ocurre en sangre periférica y en los ganglios linfáticos regionales, los LT CD8+ son el fenotipo predominante en la leche y el parénquima mamario de los bovinos, siendo la relación LT CD4/ LT CD8 < 1 (147, 148, 164). El significado funcional de la alta infiltración del parénquima mamario con LT CD8+ no ha sido hasta el momento establecido, sin embargo, se sabe que estas células pueden ejercer funciones citotóxicas o supresoras (92).

Mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia, se ha descrito una disminución en el porcentaje de LB y LT en sangre periférica durante la mastitis aguda. Simultáneamente, se ha observado un aumento en el número de LB y LT en los ganglios linfáticos supramamarios de bovinos con mastitis con respecto al número presente en los ganglios de animales no infectados. Este aumento podría deberse a la expansión local de las células o a la migración desde otros sitios (185). En un estudio realizado recientemente sobre leche de vacas con mastitis, se observó un aumento en el porcentaje de LT CD4+ a partir del día 3 post-infección. Sin embargo, este aumento no se observó en todas las vacas infectadas y tampoco se correlacionó con el número de bacterias recuperadas en

la leche (164). Otros autores han observado un aumento en el porcentaje de LT CD4+ en sangre periférica y leche de vacas naturalmente infectadas con *S. aureus*, sugiriendo un rol protector para estas células durante la infección (140).

1.3.3. INMUNIDAD DE LA GLANDULA MAMARIA DURANTE EL PERIODO PERINATAL

Numerosas evidencias indican que los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos de la glándula mamaria se encuentran alterados durante el período perinatal, momento en el cual la susceptibilidad para la infección *Ima* es mayor (55, 60, 71, 74, 75, 76, 92). La alteración del sistema inmune comienza aproximadamente 3 semanas antes del parto, es máxima al momento del parto y continúa durante las 3 primeras semanas de la lactancia (92). Entre las alteraciones observadas, se demostró una significativa disminución en la actividad de los neutrófilos durante el período perinatal (60, 113), así como una disminución en las concentraciones de IgG₂ en suero (34). Los linfocitos obtenidos de los ganglios linfáticos drenantes y de secreciones de la glándula mamaria durante el período perinatal, han mostrado menor actividad bactericida y escasa respuesta a mitógenos y antígenos en ensayos *in vitro* (80, 92, 147, 148). Mediante el uso de anticuerpos específicos, se han caracterizado las poblaciones de linfocitos presentes en sangre periférica, parénquima mamario, ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria y leche en diferentes períodos de la lactancia (124, 148, 163). Durante el período perinatal, se ha descrito una disminución en el porcentaje de LT en leche (16%) y un posterior aumento hacia el final de la lactancia (62%) (124). Asimismo, se ha observado una disminución en el número de LT CD8+ y de LT $\gamma\delta$ en el parénquima mamario, así como una disminución en el número de LT CD4+ y LT CD8+ en sangre periférica, con el consiguiente aumento de monocitos y neutrófilos (148). Park *et al.* han informado un aumento en el número de LT CD8+ que expresan la molécula de activación ACT2 y el marcador $\gamma\delta$ N12 en leche, durante el período perinatal. Se ha postulado que estas células podrían jugar un rol importante en la regulación y expresión de la respuesta inmune local contra diversos patógenos (124).

Hallazgos posteriores indicaron que la presencia de LT CD8+ACT2+N12+ sería responsable de la supresión de la respuesta proliferativa de los LT CD4+ y que la supresión sería aún mayor si la glándula se encuentra infectada (125). Estudios recientes con LT CD8+ de la glándula mamaria bovina, sugirieron que el rol inmunorregulatorio de estas células depende del período de la lactancia (149). En ese estudio, los autores demostraron que las células obtenidas durante la lactancia poseían actividad citotóxica, mientras que esta actividad no se manifestó en células obtenidas durante el período inmediato post-parto. Asimismo, se observó que las células obtenidas en el período inmediato post-parto expresaron principalmente ARNm para IL-4, lo cual es característico del fenotipo supresor, en contraste con la alta expresión de ARNm para IFN- γ observada en LT citotóxicos (149). No se observaron variaciones significativas en las proporciones de diferentes poblaciones linfocitarias en ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria durante el período post-parto. Sin embargo, se describió una variación importante en la funcionalidad de estos linfocitos, evidenciada por una menor actividad bactericida en el período perinatal (147, 148). En adición a la alteración en la proporción de las diferentes poblaciones celulares, se describió una disminución en la concentración de citoquinas regulatorias críticas como IL-2 e IFN- γ durante el período perinatal (135, 157). Se ha postulado que las diferentes proporciones de subpoblaciones linfocitarias observadas en la glándula mamaria (parénquima o secreciones) y sangre periférica en las cercanías del parto, podría deberse al tráfico y migración selectivos de células a través de la interacción con moléculas de adhesión específicas (126, 163). Sin embargo, la relación precisa entre la expresión diferencial de moléculas de adhesión y una disminuida funcionalidad de los linfocitos de la glándula mamaria como resultado de la redistribución de las poblaciones linfocitarias aún debe ser establecida (92).

1.4. PATOGENESIS DE LAS INFECCIONES *Ima* POR *S. aureus*

1.4.1. ENTRADA DE *S. aureus* A LA GLANDULA MAMARIA

En el hombre las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* son comensales habituales de la piel y las mucosas. En el ganado, la piel de las ubres y pezones, así como las ubres infectadas son el principal reservorio de *S. aureus* (20, 161). En prácticamente todos los casos, las bacterias causantes de mastitis logran penetrar la glándula mamaria a través del canal del pezón. *S. aureus* puede colonizar el extremo del canal del pezón, especialmente cuando éste se encuentra dañado o erosionado. Una vez allí, la bacteria puede persistir y ascender por multiplicación a través del canal. El ascenso puede ocurrir por propulsión directa (movimientos de las bacterias, capilaridad) o indirecta (impactos por la máquina de ordeñar) o por ambos procesos (161). La colonización del canal del pezón parecería ser un paso indispensable para el desarrollo de la infección y cuanto más cerca de la cisterna ocurre la colonización del canal, mayor es el riesgo de infección (19, 161). El contacto de las bacterias con la leche puede permitir su transferencia dentro de la cisterna cuando la presión *Ima* aumenta (10, 12).

1.4.2. COLONIZACION DE LA GLANDULA MAMARIA

Numerosos estudios han demostrado que la leche es un excelente medio para el desarrollo de *S. aureus*, ya que esta bacteria es capaz de hidrolizar la caseína y de fermentar la lactosa. Por lo tanto, una vez que *S. aureus* alcanza la cisterna, el contacto con la leche le brinda un medio óptimo para su desarrollo dentro de la glándula mamaria (12, 83).

1.4.2.1. Rol de las adhesinas

Se ha sugerido que el primer paso en la colonización de la glándula mamaria por *S. aureus*, es la adhesión a las células epiteliales. En este sentido, se ha propuesto que interacciones específicas y no específicas entre receptores

de la pared bacteriana y componentes de las células del huésped estarían involucradas en el proceso de adherencia (161). La mayoría de las cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos con mastitis poseen una superficie altamente hidrofóbica que podría favorecer la adhesión de las bacterias a las células del huésped mediante interacciones hidrofóbicas con la membrana celular. Asimismo, *S. aureus* puede unirse a proteínas extracelulares del huésped tales como colágeno y fibronectina (65, 85, 161). La presencia de receptores para fibronectina (FnBP) y colágeno (CnBP) se demostró en cepas de *S. aureus* aisladas de leche de bovinos infectados (93, 94). Estas adhesinas pueden mediar la unión de *S. aureus* a las células epiteliales y a microlesiones del epitelio mamario, donde la lámina basal y el tejido conectivo (ambos ricos en fibronectina y colágeno) se encuentran expuestos (93). Se ha sugerido además que la FnBP podría mediar la internalización de *S. aureus* en las células epiteliales (37).

1.4.2.2. Expresión de factores antifagocíticos: proteína A y cápsula

El principal mecanismo de defensa innato de la glándula mamaria contra las infecciones por *S. aureus* es la fagocitosis por neutrófilos (101). La reacción inflamatoria que se produce ante la entrada de *S. aureus* a la glándula mamaria no es suficiente para la eliminación total de la bacteria, sino que ejerce un control parcial de la infección, la cual evoluciona hacia un estado crónico o subclínico como resultado del balance entre la multiplicación bacteriana y los mecanismos de defensa. Como se mencionó anteriormente, este balance puede ser explicado en parte por la escasa respuesta inflamatoria que *S. aureus* produce al depositarse sobre la mucosa mamaria, por la baja eficiencia de la fagocitosis debido a la ingestión de caseína y grasa y por la baja concentración relativa de anticuerpos opsonizantes específicos para *S. aureus* en la leche. Asimismo, la producción de factores antifagocíticos por *S. aureus* tales como proteína A y cápsula polisacáridica podrían tener un rol fundamental en la inhibición de la fagocitosis (161).

La proteína A de *S. aureus* (Spa) es una proteína de superficie que posee

la capacidad de unir IgG de numerosas especies de mamíferos a través de su región constante (porción Fc). Se ha demostrado que la Spa, tanto libre como unida a la superficie bacteriana, es capaz de inhibir la fagocitosis por neutrófilos *in vitro* (161). La unión de IgG en la orientación inversa, le daría a la bacteria una cobertura protectora frente a la fagocitosis. El rol de la Spa como factor de virulencia *in vivo* depende del tipo de infección investigada. Estudios realizados con cepas mutantes deficientes en la expresión de Spa o cepas mutantes con expresión aumentada de dicha proteína han arrojado diferentes resultados de acuerdo al modelo utilizado. En un estudio realizado con una mutante deficiente, se observó una marcada disminución en la virulencia de *S. aureus* en un modelo murino de bacteriemia (128). Por el contrario en una investigación realizada por Jonsson *et al.* no se observaron diferencias en la virulencia de cepas Spa- y Spa+ en un modelo murino de mastitis (73).

S. aureus puede producir una cápsula polisacáridica (CP) que, durante el crecimiento bacteriano en la ubre, interfiere con las defensas de la glándula. Esta cápsula (o pseudocápsula en algunos aislamientos) inhibe la acción fagocítica y bactericida de los neutrófilos mediante el bloqueo de los receptores necesarios para identificar y dar muerte a *S. aureus* (115). *S. aureus* produce CP *in vivo* o bajo condiciones de cultivo definidas, habiéndose descrito 11 serotipos capsulares. Las cepas productoras de CP de tipo 1 y 2 poseen una cápsula gruesa y producen colonias mucoides al ser cultivadas en medio sólido. El rol crítico de estos dos tipos de CP en la patogénesis ha sido bien establecido (89). Por el contrario, las cepas de *S. aureus* productoras de CP de tipo 3 a 11 son microcapsuladas y el rol de la microcápsula en la virulencia no es totalmente claro, dependiendo en gran medida del modelo animal utilizado (89). Entre los 11 serotipos capsulares que se han propuesto para *S. aureus*, los serotipos capsulares 5 (CP5) y 8 (CP8) son los predominantes en aislamientos provenientes de humanos infectados. Sin embargo, existe considerable variabilidad en la prevalencia de CP5 y CP8 en aislamientos provenientes de bovinos con mastitis de diferentes regiones geográficas del mundo (61, 167). En un estudio realizado en nuestro país, sólo el 14% de los aislamientos analizados expresaron CP5 o CP8 (154). Estos resultados, plantean considerables dudas

acerca de la importancia de la CP como un factor clave en la patogénesis de la mastitis bovina. Mientras que varios investigadores demostraron que la cápsula aumenta la virulencia de *S. aureus* en modelos animales de bacteriemia, artritis séptica e incluso en modelos letales de infección (117, 166), también se observó que la cápsula atenúa la virulencia en un modelo de endocarditis en ratas (14). Hasta el presente no se han realizado estudios que evalúen el rol de CP5 y CP8 en modelos animales de mastitis (154).

1.4.3. ALTERACIONES EN LA GLANDULA MAMARIA INFECTADA

Al realizar una evaluación a nivel de rodeos, los cuartos mamarios pueden clasificarse como infectados o no infectados. En un rodeo afectado por la mastitis, una pequeña proporción de los cuartos infectados presentará síntomas de mastitis clínica, una proporción mayor sufrirá de mastitis subclínica y una proporción variable tendrá sólo colonización temporaria del pezón. Cada cuarto evolucionará independientemente del otro, pudiendo estar sano o afectado, clínica o subclínicamente (31).

Al comienzo de la infección, generalmente sólo pequeñas áreas del cuarto afectado se verán dañadas, con pérdida funcional de los alvéolos involucrados. Las células de los alvéolos y pequeños conductos mamarios degeneran, mueren y son descamadas. Este material, sumado a la acumulación de leucocitos y fibrina, producen coágulos que bloquean los conductos mayores, impidiendo el pasaje de la leche que proviene de áreas aún funcionales. Los conductos cerrados pueden reabrirse esporádicamente, liberando bacterias a otras áreas del cuarto infectado. Este proceso se repite múltiples veces durante días o semanas, provocando la infección permanente de áreas vecinas. Si las bacterias sobreviven en los tejidos afectados, los microabscesos aumentan de tamaño hasta hacerse clínicamente palpables (58).

La infección *Ima* por *S. aureus*, que a menudo comienza con una fase aguda caracterizada por signos y síntomas sistémicos (fiebre) y locales (congestión de la ubre, coagulación de la leche), suele rápidamente

transformarse en crónica y el único cambio visible es la presencia de unos pocos coágulos en la leche. El curso crónico de la mastitis por *S. aureus* implica la involución de los alvéolos y el taponamiento de los conductos, siendo el tejido secretor reemplazado por tejido fibrótico no funcional. La falta de ordeño de esos cuartos acelera el grado de fibrosis. La infección crónica a menudo alterna con un estado subclínico, en el cual la enfermedad es detectada por el aislamiento de *S. aureus* a partir de la leche y la presencia de más de 5×10^5 células somáticas/ml de leche (12).

Los cambios histopatológicos de la glándula mamaria durante la infección por *S. aureus* fueron investigados mediante examinación microscópica de secciones de glándulas naturalmente infectadas o experimentalmente inoculadas con bacterias a través del canal del pezón o de la piel. La mastitis estafilocócica es esencialmente una enfermedad en la cual la bacteria se multiplica en el sistema de ductos y los cambios histopatológicos se deben fundamentalmente a la multiplicación bacteriana. Asimismo, la reacción no es homogénea a través del cuarto infectado y diferentes lesiones histológicas pueden observarse alternadas con áreas de tejido normal. El desarrollo de la mastitis puede dividirse en cuatro etapas (12, 161):

- a. El proceso inflamatorio comienza con una reacción del endotelio de los capilares cercanos a las células alveolares atacadas. Durante esta fase aguda, se incrementan tanto el flujo sanguíneo en el lecho capilar como la permeabilidad del endotelio y los leucocitos sanguíneos comienzan a unirse al endotelio.
- b. En la fase subaguda, los monocitos y neutrófilos migran desde la sangre y el intersticio circundante al tejido afectado, lo cual resulta en el bloqueo parcial o total de los alvéolos, los cuales comienzan a involucionar. Al mismo tiempo comienzan los cambios en la composición de la leche. El 80 % de las células recuperadas son neutrófilos, se altera la composición proteica relativa y aumentan los niveles de una gran cantidad de enzimas tales como catalasa, fosfatasa, peroxidasa, xantino-oxidasa, lipasa, proteinasa, lisozima,

antitripsina y N-acetil- β -D-glucosaminidasa. Estos cambios en la leche constituyen un elemento indirecto para el diagnóstico.

- c. El final del proceso inflamatorio (fase crónica proliferativa), implica la disminución o el cese de la actividad sintética y secretoria de leche debido a lesiones de las células epiteliales secretorias alveolares de severidad variable, que pueden provocar su degeneración o lisis total.
- d. Por último se produce la proliferación del tejido conectivo y la acumulación de fragmentos celulares en los alvéolos como consecuencia de la lisis de células epiteliales y leucocitos. Este fenómeno puede llevar a la oclusión del alvéolo con acumulación de bacterias. El foco de infección resultante puede liberar bacterias a otras áreas de la glándula libres de infección o evolucionar dando lugar a la formación de un granuloma.

1.4.3.1. Rol de las citotoxinas de *S. aureus* en la infección *Ima*

La severidad del daño de las células alveolares durante la multiplicación bacteriana en el epitelio secretor dependerá fundamentalmente de la especie bacteriana involucrada y de las sustancias citotóxicas que la misma sea capaz de producir. En este sentido, *S. aureus* posee los factores de virulencia más poderosos, entre ellos las hemolisinas α , β , γ y δ . Las hemolisinas α y γ poseen la capacidad de incorporarse a la estructura de la membrana celular de la célula atacada, formando poros que modifican la permeabilidad de la membrana al agua e iones, lo que lleva a la lisis osmótica de la célula blanco. La hemolisina δ forma una hélice α anfipática que actuaría como surfactante, provocando la lisis celular muy rápidamente. La hemolisina β , es una esfingomielin-fosfolipasa que altera la estructura lipídica de la membrana celular (18, 133, 161). Dos de estas citotoxinas, las hemolisinas α y β , parecen estar más fuertemente involucradas en la patogénesis de las infecciones *Ima* (161). La hemolisina α es producida por entre el 20 y el 50 % de los aislamientos de leche de bovinos con mastitis (2, 161) y es responsable de gran parte del daño tisular durante las infecciones estafilocócicas. En estudios realizados con cepas mutantes en las cuales la

expresión de hemolisina α estaba alterada, se demostró una menor virulencia durante la infección de la glándula mamaria murina, en comparación con la cepa parental productora de la hemolisina (73). Entre el 75% y 100% de las cepas de *S. aureus* provenientes de bovinos con infección *Ima* producen además hemolisina β (2, 161). El rol de la hemolisina β en la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* no se encuentra completamente dilucidado. Esta toxina sería incapaz por sí sola de lisar células epiteliales, pero podría actuar en forma sinérgica con el factor CAMP producido por *Streptococcus* grupo B y participar así en la destrucción del tejido alveolar. El elevado nivel de expresión de hemolisina β en aislamientos provenientes de bovinos infectados indica que las cepas productoras de esta toxina contarían con cierta ventaja adaptativa. En un estudio reciente, utilizando un modelo murino, se demostró que cepas de *S. aureus* productoras de hemolisina β presentaban mayor capacidad de multiplicar en la glándula mamaria que las cepas isogénicas no productoras de la hemolisina (36). Asimismo, recientemente se ha propuesto que las hemolisinas producidas por *S. aureus* participarían en el escape de la bacteria desde el endosoma hacia el citoplasma de las células epiteliales, contribuyendo así a la persistencia en el medio intracelular (41).

1.4.3.2. Rol de las enzimas extracelulares y coagulasa de *S. aureus* en la infección *Ima*

S. aureus produce numerosas enzimas extracelulares, tales como hialuronidasa, fosfatasa, nucleasa, lipasa, catalasa, fibrinasa, collagenasa y serino-proteasa. Dichas enzimas se encuentran involucradas en la patogenia de las infecciones *Ima*, ya que facilitan la difusión de la bacteria en el tejido mamario (13). Además, la producción de exoenzimas le permitiría utilizar sustratos presentes en la leche para su metabolismo, adaptarse al medio que le brinda la leche y multiplicar en ella (161).

El rol de la enzima coagulasa en la virulencia de *S. aureus* fue estudiado en ratones. La inoculación de coagulasa purificada en la glándula mamaria de

ratones causó el influjo de neutrófilos hacia los alvéolos e hiperplasia del epitelio mamario (11). En estudios realizados con mutantes deficientes en la producción de coagulasa se observó una marcada reducción en la virulencia, además de un efecto sinérgico con la hemolisina α (81). Sin embargo, estos resultados no pudieron ser confirmados por Phonimdaeng *et al.* (130). Asimismo, se ha postulado que la enzima coagulasa podría tener un efecto inhibitorio sobre los neutrófilos, el cual no pudo ser confirmado en experimentos posteriores. En otro estudio realizado con cepas que poseían diferentes genotipos del gen de la coagulasa, se observó una mayor capacidad de resistir la fagocitosis y la muerte intracelular por cepas de los genotipos más frecuentemente aislados de casos de mastitis (1). A pesar de las evidencias experimentales, el rol específico de la enzima coagulasa durante la infección *Ima* aún debe ser dilucidado.

1.4.3.3. Rol de los superantígenos producidos por *S. aureus* en la infección *Ima*

Varias de las proteínas extracelulares producidas por *S. aureus* tienen la capacidad de actuar como superantígenos. Entre ellas se incluyen las enterotoxinas (SE) A, B, C, D, E, G y H, la toxina del síndrome de shock tóxico (TSST-1 o enterotoxina F) y las toxinas exfoliativas A y B (18). Los superantígenos, a diferencia de los péptidos inmunogénicos, se unen a las regiones externas de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y a la cadena β del receptor T por fuera del sitio específico de reconocimiento, formando un puente entre las células presentadoras de antígenos y los LT. De esta manera los superantígenos son capaces de mediar la activación de un gran número de clones de LT en forma inespecífica. La activación descontrolada de los LT lleva finalmente a fenómenos como anergia, apoptosis y delección de LT reactivos, entre otros (72). La SEC es la enterotoxina con actividad de superantígeno más frecuentemente producida por cepas aisladas de leche de bovinos con mastitis (78). Se ha sugerido que la SEC podría interferir con el funcionamiento normal de las células del sistema inmune. En un estudio realizado *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica bovina, se observó que la SEC era capaz de inducir la apoptosis de LT CD4⁺ y la expansión

de LT CD8+ fuertemente activadas. Se observó la expresión del marcador ACT3 en dichos LT CD8+, lo cual sugirió que este marcador podría estar asociado a un estado de activación excesiva y por lo tanto anormal (41). Asimismo, se demostró que la estimulación *in vitro* con SEC producía un aumento en la expresión de IL-4, una citoquina clave en el desarrollo de respuestas de tipo Th2, mientras que se observó una disminución en la producción de IL-12, citoquina antagonista de la IL-4 (40). En base a estos datos experimentales se ha sugerido que la producción de superantígenos por *S. aureus* durante la infección *Ima* podría inducir respuestas inmunes que permitirían la persistencia de la bacteria en el tejido infectado (41).

1.4.3.4. Internalización de *S. aureus* en células fagocíticas y no fagocíticas: rol en la patogénesis de la infección *Ima*

S. aureus ha sido tradicionalmente considerado un patógeno extracelular. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado su capacidad de penetrar y sobrevivir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas. En estudios *in vitro* se ha demostrado que *S. aureus* puede ser internalizado y sobrevivir dentro de fagocitos no profesionales tales como células endoteliales (186), células epiteliales de la glándula mamaria (17), queratinocitos (174) y osteoblastos (69). Estos hallazgos sugieren que la sobrevivencia en el medio intracelular podría contribuir a la persistencia de *S. aureus* en infecciones como endocarditis, mastitis bovina y osteomielitis (57, 91). En estudios realizados con células epiteliales de la glándula mamaria se observó que la FnBP estaría involucrada en la unión de la bacteria a las células del huésped y mediaría la internalización. Luego de la internalización, *S. aureus* podría escapar del endosoma y multiplicar en el citoplasma. El escape del endosoma podría estar mediado por alguna de las hemolisinas producidas por *S. aureus* (6, 37, 41). Asimismo, recientemente se demostró que la sobrevivencia de *S. aureus* dentro de fagocitos profesionales como los neutrófilos podría ser un evento clave para el desarrollo de la infección crónica. A partir de datos obtenidos por microscopía electrónica se ha propuesto que *S. aureus* podría ser internalizado por los neutrófilos formándose un fagosoma clásico, o bien podría formarse un macropinosoma, el cual sería

incompetente para fusionarse con los lisosomas. *S. aureus* escaparía luego al citoplasma, evitando así la activación de las células fagocíticas y los mecanismos que darían lugar a su muerte (57). En concordancia con estos hallazgos, recientemente se ha descrito la presencia de *S. aureus* viables en macrófagos obtenidos de leche de bovinos con mastitis (62). Por lo tanto, la sobrevivencia intracelular de *S. aureus* en células epiteliales y fagocitos de la glándula mamaria permitiría la persistencia del patógeno y el desarrollo de la infección crónica (17, 57).

1.5. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INFECCIONES *Ima*

Existen importantes dificultades para realizar investigaciones sobre mastitis por medio de experimentos que involucren la utilización de bovinos. Los altos costos de adquisición y mantenimiento de los animales generan importantes limitaciones en el tamaño de la muestra de los experimentos *in vivo*, así como en el número de repeticiones de un mismo experimento a fin de asegurar la reproducibilidad y certeza de los resultados obtenidos (9).

Como una alternativa a la mastitis bovina experimental, se han desarrollado modelos murinos de mastitis (9, 27). Estos modelos han sido utilizados por algunos autores en el estudio de la mastitis estafilocócica y coliforme. Los cambios histológicos y macroscópicos observados durante la mastitis experimental inducida en ratones fueron similares a los observados durante la infección natural en bovinos (27). Asimismo, se demostró la factibilidad de utilizar el modelo murino para el estudio de la mastitis por *Campylobacter coli* (35). Entre las ventajas de este modelo, cabe señalar la posibilidad de utilizar un mayor número de animales, los cuales pueden ser adquiridos y mantenidos a un bajo costo. Además, el tamaño de la glándula mamaria murina ofrece la oportunidad de realizar experimentos histológicos y bacteriológicos que involucren la glándula completa (27).

1.6. CONTROL DE LAS INFECCIONES *Ima* POR *S. aureus*

1.6.1. PROFILAXIS CON ANTIBIOTICOS

Las cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos presentan alta susceptibilidad *in vitro* a los diferentes antimicrobianos que se utilizan para el tratamiento de las infecciones *Ima*. Sin embargo, durante el tratamiento *in vivo* existe un alto grado de refractariedad a la antibioticoterapia. Como ya se ha descrito, una de las características que diferencia la patogénesis de la mastitis bovina estafilocócica con respecto a otras enfermedades causadas por *S. aureus* es que esta bacteria persiste intracelularmente en células fagocíticas de la glándula mamaria, lo que podría contribuir a la poca eficacia de la terapia antibiótica y a la re-infección de una glándula aparentemente curada. Dado que las bacterias intracelulares no son susceptibles a la acción de los antibióticos habitualmente utilizados, las células disfuncionales de la glándula mamaria servirían como un reservorio constante de microorganismos, que estarían así protegidos de los efectos del antimicrobiano y serían la causa de la infección recurrente (160, 182). Asimismo, es importante señalar que el tratamiento de vacas infectadas con antibióticos sin un control posterior de los animales puede tener importantes consecuencias sobre la salud pública, ya que la leche puede vehiculizar antibióticos residuales (116).

1.6.2. INMUNOREGULACION CON CITOQUINAS

Numerosos estudios han demostrado la capacidad reguladora de citoquinas recombinantes sobre la respuesta inmune de la glándula mamaria. Las citoquinas más estudiadas son IL-2, Factor Estimulante de Colonias (CSF) e IFN- γ (160). En estudios realizados *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la administración de IL-2 recombinante lograba exacerbar la capacidad funcional de las células mononucleares de la glándula mamaria. La exposición de las células mononucleares de la glándula mamaria a IL-2 aumentó su capacidad proliferativa frente a mitógenos, así como su actividad citotóxica y bactericida (147, 156, 168). En estudios realizados *in vivo*, se observó que la administración de IL-2 por la

ruta *Ima* inducía una mayor infiltración de neutrófilos, efecto que fue dependiente de la dosis de IL-2 administrada (158). El Factor Estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) ejerce un gran efecto sobre las poblaciones de células fagocíticas, por lo cual se ha sugerido que podría ser utilizado con fines terapéuticos en los casos de mastitis. Se ha demostrado también que la administración de esta citoquina en su forma recombinante por la ruta subcutánea a bovinos inducía un aumento en el número de células en leche y en la actividad fagocítica y bactericida de las células de la glándula mamaria (77). Se ha observado además que la administración por la ruta *Ima* de Factor Estimulante de Colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) no modificaba significativamente el número de células inflamatorias, pero aumentaba la capacidad de los neutrófilos residentes de producir anión superóxido y de dar muerte a *S. aureus* (32). El tratamiento *in vitro* de neutrófilos con IFN- γ fue capaz de revertir el efecto supresor de las secreciones de la glándula mamaria y aumentar la capacidad funcional de estas células contra *S. aureus* (159). En otros estudios se demostró que la administración de IFN- γ por la ruta *Ima* inducía un aumento en la capacidad fagocítica y bactericida *in vivo* de neutrófilos de la glándula mamaria (45).

En base a estas evidencias experimentales, se ha propuesto que la administración de citoquinas bovinas que activan la función celular fagocítica, concomitantemente con antibióticos que puedan reducir en forma significativa la carga bacteriológica, resultaría un método posible, aunque muy costoso, para optimizar la terapia para la mastitis (160).

1.7. INMUNOPROFILAXIS DE LAS INFECCIONES *Ima*

El objetivo final de la investigación sobre enfermedades es su prevención y uno de los caminos más efectivos para lograrla es la vacunación del huésped susceptible (51). La mayoría de las vacunas existentes están diseñadas para la prevención o el control de infecciones virales o bacterianas agudas. El desarrollo de vacunas para la prevención de enfermedades crónicas requiere un conocimiento más detallado del rol de las diferentes respuestas inmunes y de los

caminos más efectivos para generar respuestas particulares. Los estudios en modelos experimentales son las principales fuentes de esta información y también proveen un mejor conocimiento de la razón por la cual algunas vacunas de uso corriente son tan exitosas (5).

La inmunización activa para la prevención de la mastitis bovina causada por *S. aureus* se ha practicado anteriormente (44, 56, 184). En los experimentos de vacunación que mostraron resultados favorables, la inmunización pareció reducir la ocurrencia y severidad de la mastitis clínica e incrementó la cura espontánea, pero no previno la nueva infección *Ima* (23, 118, 176). La vacunación ha sido utilizada para incrementar las concentraciones de anticuerpos anti-*S. aureus* en suero y en leche, como una manera de otorgar inmunidad por inhibición del crecimiento bacteriano y de la producción de toxinas (115).

En experimentos realizados con una bacterina de *S. aureus* que estimulaba la producción de anticuerpos dirigidos contra la pseudocápsula, se demostró un aumento en la fagocitosis (176). Investigaciones posteriores, demostraron que la administración de esta bacterina en el período de involución de la glándula, seguido de una nueva inoculación seis semanas después, reducía significativamente la incidencia de nuevas infecciones luego del desafío experimental con *S. aureus* (114). A pesar de estas observaciones, el procedimiento descrito no se utiliza en la práctica como método inmunoproláctico.

Se ha sugerido que las vacunas capaces de conferir una amplia protección contra la mastitis estafilocócica necesitarían contener al menos antígenos de la pseudocápsula y toxoides de la hemolisina (178). Watson demostró que una vacuna compuesta por *S. aureus* muerto cultivado bajo condiciones que favorecieran la producción de pseudocápsula, combinado con toxoides de la bacteria y dextrán sulfato como adyuvante, protegía contra la mastitis clínica causada por diferentes cepas de *S. aureus* en bovinos desafiados experimentalmente (177). En estudios de campo posteriores realizados con un

número mayor de animales (1819 vacas pertenecientes a 7 tambos) se observó que a pesar que el número de casos de mastitis clínica y subclínica era menor en el grupo de animales vacunados (45 casos contra 67 casos en animales control), esta diferencia no resultó estadísticamente significativa al considerar todos los tambos en forma conjunta. En el tambo con mayor prevalencia de mastitis por *S. aureus*, sin embargo, la vacunación redujo la incidencia de mastitis clínica y subclínica causada por dicho patógeno (179).

En otro estudio de campo multicéntrico realizado recientemente, se probó una vacuna que contenía bacteria muerta (de una cepa productora de pseudocápsula), los toxoides de las hemolisinas α y β y aceite mineral como adyuvante. Nuevamente, a pesar que la incidencia de mastitis clínica y subclínica fue menor en el grupo vacunado (8.6% contra 16 % en el grupo control) no se observaron diferencias estadísticamente significativas (118). Interesantemente, en este estudio se detectaron elevados niveles de IgG₂ específica contra la pseudocápsula en el suero pero no en la leche de los animales inmunizados. Se encontraron anticuerpos neutralizantes anti-hemolisina α de tipo IgG₁ tanto en la leche como en el suero de los animales vacunados. Por el contrario, el título de anticuerpos neutralizantes anti-hemolisina β era significativamente mayor en el suero de los animales vacunados, pero no se observó un aumento significativo de dichos anticuerpos en la leche con relación a los animales control (119).

Asimismo, se ha investigado la capacidad protectora de vacunas conjugadas que incluían CP5 o proteínas de superficie como FnBP y proteína A (183). Gilbert *et al.* demostraron que una vacuna compuesta por CP5 conjugado a ovoalbúmina administrada en adyuvante incompleto de Freund fue capaz de inducir la producción de anticuerpos de tipo IgG₂ específicos contra CP5 (54). La relevancia de estos hallazgos reside en que los anticuerpos de tipo IgG₂ poseen gran actividad opsonizante. En un trabajo reciente, se describió el uso de una vacuna en la que se conjugaba CP5 a la hemolisina α . La inmunización por la ruta subcutánea de bovinos durante el período de lactancia con hemolisina α sola, hemolisina α más CP5 o hemolisina α conjugada a CP5 en adyuvante

completo de Freund indujo un aumento en el reclutamiento inmune de neutrófilos activados hacia la glándula mamaria (63). En un ensayo realizado utilizando la proteína A como inmunógeno en presencia de adyuvante completo de Freund, pudo demostrarse un incremento en la tasa de cura espontánea y una disminución en el número de células somáticas en leche. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la aparición de nuevas infecciones *Ima*, producción de leche o mastitis clínica (123). La FnBP se ha estudiado también como posible componente de una vacuna para prevenir la mastitis. La inmunización con FnBP recombinante indujo una reducción en la severidad de la infección en un modelo murino de mastitis experimental, así como una disminución en la incidencia de mastitis clínica en un grupo reducido de bovinos (95, 112). A pesar de lo promisorios que resultaron estos hallazgos, ninguna de las vacunas experimentales que han utilizado proteínas de superficie y CP como inmunógenos ha otorgado protección en ensayos de campo (184).

Una vacuna combinada se evaluó recientemente en 3 tambos con alta incidencia de mastitis por *S. aureus* en Argentina (23, 56). Esta vacuna consistió en una preparación de bacterias muertas que incluyeron 2 cepas diferentes de *S. aureus*, una cepa de *Streptococcus uberis* y una cepa de *Streptococcus agalactiae*, junto con un extracto crudo de cápsula de *S. aureus* e hidróxido de aluminio como adyuvante. Esta vacuna indujo protección contra la mastitis clínica y subclínica provocada por *S. aureus* que resultó estadísticamente significativa tanto a nivel de tambos como de animales al ser comparados con el grupo control (vacunado con hidróxido de aluminio). Por el contrario la vacunación no tuvo efecto sobre la mastitis producida por cepas del género *Streptococcus*. La diferencia en los resultados obtenidos en este ensayo con respecto a los obtenidos por Watson, probablemente podría deberse a que estas vacunas resultan más eficaces en tambos con alta prevalencia de infección por *S. aureus* (184). Al respecto, resta determinar la eficacia de la vacuna propuesta por Calzolari et al. en la prevención de la mastitis por *S. aureus* en estudios que comprendan mayor número de animales y tambos.

En conclusión, a pesar de los múltiples esfuerzos realizados, no se cuenta hasta el presente con una vacuna realmente efectiva de uso práctico que prevenga las infecciones *Ima* por *S. aureus*. La falta de éxito de los intentos realizados para inmunizar contra la mastitis estafilocócica, probablemente pueda deberse a la elección de antígenos inapropiados así como a la utilización de rutas de vacunación y regímenes inadecuados.

Asimismo, en la actualidad, numerosos estudios han demostrado que *S. aureus* puede ser internalizado y sobrevivir dentro de fagocitos profesionales y no profesionales y ha sido señalada la importancia de *S. aureus* como patógeno intracelular facultativo en la patogénesis de la infección *Ima*. La capacidad de *S. aureus* de inducir una respuesta inmune temprana de tipo Th2 junto con su capacidad para invadir células epiteliales y ser incorporado por macrófagos en forma no estimuladora (según se describió anteriormente), podría permitir la sobrevivencia de *S. aureus* en un huésped inmunocompetente (41). En este sentido, es importante destacar que en los estudios de vacunación realizados hasta el presente no se ha considerado la necesidad de inducir inmunidad tanto humoral como mediada por células localizada en la glándula mamaria, lo cual podría contribuir a la falta de éxito de los ensayos realizados.

1.7.1. CEPAS BACTERIANAS ATENUADAS COMO INMUNOGENOS

Las vacunas vivas usualmente proveen inmunógenos con mayor capacidad protectora tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, ya que los procedimientos químicos y físicos utilizados para la preparación de vacunas muertas pueden alterar los inmunógenos. La estimulación de las defensas locales por el agente vivo, ya sea a través de infección natural o a través de inmunización con una cepa atenuada, ha sido reconocida como el más efectivo inductor de inmunidad duradera (99). Las vacunas compuestas por cepas vivas podrían estimular la inmunidad de larga duración, ya que el organismo se multiplicaría en el huésped y de esta manera produciría una continua estimulación del sistema inmune, tanto local como sistémicamente (86, 99).

Desde los comienzos de la Microbiología, las cepas bacterianas atenuadas han sido utilizadas para inducir inmunidad contra enfermedades infecciosas. Se han propuesto diferentes métodos para la atenuación de patógenos bacterianos a fin de obtener vacunas vivas (106). Entre ellos, la inducción de mutaciones termosensibles (*ts*) en genes esenciales mediante mutagénesis puntual ha sido satisfactoriamente utilizada en la obtención de cepas atenuadas de patógenos humanos y animales (26, 47, 66, 67, 152). La atenuación por termosensibilidad ofrece varias ventajas específicas sobre otras formas de atenuación genética. Estas cepas mutantes resultarían seguras, ya que el problema inherente a la reversión a la virulencia sería superado combinando múltiples mutaciones en una cepa, reduciendo de esta manera la frecuencia de reversión a valores insignificantes (153). Además, estos mutantes contendrían todos los antígenos de superficie del patógeno salvaje, en su conformación natural (106). Otra de las ventajas de las cepas *ts* es que el método utilizado para aislarlas puede ser manipulado para producir cepas que replican hasta un grado limitado (mutantes de "replicación limitada") en la vacuna, reproduciendo de esta manera los estadios iniciales de la infección natural y prolongando la estimulación del sistema inmune. La utilización de mutantes *ts* como vacunas fue probada para el control de enfermedades virales y bacterianas en humanos y animales, obteniéndose resultados promisorios (86).

1.7.2. RUTA DE ADMINISTRACION DEL INMUNOGENO

Se han considerado muchas estrategias para exacerbar la respuesta inmune de las mucosas, entre ellas la vía de administración del inmunógeno (144). La elección de una apropiada ruta de inmunización puede determinar el éxito o el fracaso de la vacunación. El tipo de inmunidad requerida no es la misma para todas las enfermedades y una vacuna que previene una infección sistémica puede no ser efectiva contra una infección localizada en las mucosas y viceversa. La administración de vacunas por la vía sistémica general resulta en respuestas humorales y celulares sistémicas efectivas, pero inefectivas para la inducción de inmunidad a nivel de las mucosas en individuos que no hayan tenido un encuentro previo con el microorganismo en cuestión (99, 146). La inmunización local, por el contrario, usualmente estimula la inmunidad de las

mucosas, parece mimetizar la exposición natural al patógeno y confiere protección contra la infección por patógenos que normalmente entran al organismo a través de las mucosas (171).

Un aspecto importante de la inmunidad de mucosas y de la inmunización local es la migración de LB y LT activados específicamente desde las placas de Peyer (PP) (en el GALT) a la lámina propia del epitelio intestinal y otras mucosas fuera del tracto gastrointestinal. Los antígenos administrados en forma oral son internalizados a través de células epiteliales especializadas (células M) en las PP donde ocurre la sensibilización de los linfocitos vírgenes. Luego de la estimulación antigénica los LT y LB activados abandonan las PP a través de los vasos linfáticos eferentes y son volcadas a la circulación por medio del conducto torácico. Estos linfocitos llegan por la circulación a sitios efectores de la respuesta inmune, tales como la mucosa de los tractos respiratorio, gastrointestinal, urogenital y tejidos glandulares (21, 98). Se ha demostrado que en las especies monogástricas, la sensibilización de los linfocitos por la ruta gastrointestinal inducía la aparición de anticuerpos específicos protectores en las secreciones de la glándula mamaria. Sin embargo, la comunicación entre el GALT y la mucosa de la glándula mamaria no sería efectiva en todas las especies. En estudios realizados en rumiantes se demostró la ausencia de anticuerpos específicos en leche luego de la inmunización por la ruta oral, lo cual sugeriría una disminuida capacidad de los linfocitos del GALT de los rumiantes de migrar hacia la glándula mamaria. Estudios realizados luego de la estimulación local de la glándula mamaria bovina demostraron que las células efectoras provendrían de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula. Estas evidencias permitieron sugerir que la glándula mamaria de los rumiantes no estaría integrada completamente al sistema común de mucosas por lo que la mayor estimulación inmune podría lograrse mediante la inmunización local (22).

1.8. HIPOTESIS

La susceptibilidad para las infecciones *Ima* se ha asociado a la escasa presencia de anticuerpos opsonizantes y neutralizantes en la glándula mamaria junto a una actividad disminuida de los neutrófilos y linfocitos en dicho tejido. Estos factores, sumados a la capacidad de *Staphylococcus aureus* de generar sólo una respuesta inflamatoria leve sobre mucosas sanas y de sobrevivir en forma intracelular, serían las principales causas de las infecciones *Ima* crónicas por esta bacteria. Hasta el presente, no se cuenta con una vacuna efectiva de uso práctico que permita prevenir las infecciones *Ima* por *S. aureus*. La falta de éxito de los intentos realizados probablemente se deba a la elección de inmunógenos inapropiados, así como a la utilización de rutas de vacunación y regímenes inadecuados. El diseño racional de una vacuna requiere un inequívoco conocimiento de los mecanismos de patogénesis de la bacteria, de los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa que se requieren para la erradicación del patógeno durante la infección natural y de los mecanismos de evasión que el patógeno interpondrá frente a ésta respuesta.

La hipótesis de trabajo de esta línea de investigación postula que la estimulación antigénica local de la glándula mamaria de los rumiantes sería el método más eficaz para producir la exacerbación de los mecanismos de defensa contra patógenos bacterianos. De esta manera, la inducción de la respuesta inmune adaptativa tendría lugar en la proximidad del epitelio involucrado. Se propone además que la mejor respuesta inmune podría lograrse utilizando cepas vivas atenuadas como inmunógenos, administradas en el momento apropiado. Estas cepas contarían con la ventaja de producir todos los factores de patogenicidad involucrados durante las etapas tempranas de la infección, lo cual sería la mejor manera de mimetizar la infección natural. Asimismo, se considera que la inducción de una respuesta inmune, tanto humoral como mediada por células en la glándula mamaria, sería un requisito indispensable para la prevención de las infecciones *Ima* por *S. aureus*.

1.9. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de investigación es proveer conocimiento acerca de las respuestas inmunes, tanto humorales como celulares, que es necesario inducir en la glándula mamaria para prevenir las infecciones por *Staphylococcus aureus*. La concreción de este objetivo requiere a su vez la determinación del inmunógeno a utilizar, su vía de administración y el plan de inmunización adecuado para inducir la respuesta inmune más eficiente en la glándula mamaria. Los conocimientos obtenidos en este trabajo permitirán el diseño racional de un procedimiento inmunoproláctico para prevenir las infecciones *Ima* estafilocócicas.

1.10. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtención de cepas vivas atenuadas (CVA) por termosensibilidad de *S. aureus* y su caracterización *in vitro*.
2. Determinación de la atenuación e inmunogenicidad de cepas termosensibles de *S. aureus* en un modelo murino de infección sistémica.
3. Desarrollo de un modelo murino de mastitis por la cepa 8325-4 ϕ 11 de *S. aureus*: estudios bacteriológicos e histopatológicos en la glándula mamaria.
4. Estudio de la permanencia e inocuidad de una CVA de *S. aureus* al ser administrada por la ruta local intramamaria (*Ima*).
5. Evaluación de la capacidad de una CVA de *S. aureus* de otorgar protección durante el desarrollo de la mastitis experimental por la cepa virulenta parental.
6. Comparación de la eficacia de diferentes rutas de inmunización en la protección frente a la infección *Ima* por *S. aureus*.

7. Determinación del período óptimo de inmunización durante la preñez o la lactancia para inducir inmunidad protectora en la glándula mamaria.
8. Evaluación de la capacidad de una CVA de *S. aureus* de inducir la producción de anticuerpos específicos en la glándula mamaria.
9. Caracterización de las poblaciones linfocitarias presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria y su estado de activación luego de la inmunización local con una CVA de *S. aureus*.
10. Evaluación de la capacidad de una CVA de *S. aureus* de inducir inmunidad celular en la glándula mamaria luego de ser administrada por la ruta local *Ima*.
- 10.a. Estudio de las poblaciones de linfocitos involucradas y de las citoquinas producidas durante la respuesta secundaria *in vitro* contra *S. aureus* inducida por la inmunización *Ima* con la CVA.
- 10.b. Estudio de las poblaciones de linfocitos involucradas y de las citoquinas producidas durante la respuesta inmune celular *in vivo* contra *S. aureus* inducida por la inmunización *Ima* con la CVA.

2. Materiales y Métodos

2.1. SOLUCIONES

Buffer Bicarbonato: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6.

Buffer de siembra: 0,2% azul de bromofenol (cat# B-5525, Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO), 4% SDS (cat# 15525, Life Technologies, Gaithersburg, MD), 10% 2-β-mercaptoetanol (cat# M3148, Sigma), 20% glicerol, en TBS.

Buffer de corrida: 0,1% SDS, 192 mM glicina (cat# 15527, Life Technologies), 25 mM Tris (cat# T-6066, Sigma), pH: 8,3.

Buffer FACS: PBS-2% SBF (suero fetal bovino, cat# 16000, Life Technologies).

PBS: 10 mM Fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7,4.

PBS-Tween: PBS-0,05% Tween 20.

PBS-BSA-Tween: PBS-1%BSA-0.05% Tween 20 (BSA: albúmina bovina, fracción V, cat# A-7906, Sigma).

Solución decolorante: 45% metanol, 10% ácido acético.

Solución de Tinción: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R (Sigma), 45% metanol, 10% ácido acético.

TBS: 0.05 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, pH 7,6.

TBS-suero: TBS-5% suero de cabra.

Pentobarbital: 550 mg Pentobarbital, 20 mg Propilenglicol, 10 ml alcohol, 80 ml agua destilada.

RPMI-SFB: Medio RPMI 1640 (cat# 11875-093, Life Technologies) adicionado con SFB 2% (lavados celulares) o 10% (cultivo celular).

Solución de bloqueo: PBS-2% BSA.

Solución diluyente: PBS-1% BSA.

2.2. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIGENOS

Se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* NTCC 8325-4 φ 11, gentilmente cedida por el Dr. John J. Iandolo (Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.).

Las preparaciones de BCG viable y PPD fueron gentilmente provistas por la Dra. Lucía Barrera (Instituto Nacional de Microbiología "Carlos G. Malbrán"). A partir

de preparaciones de BCG liofilizadas de densidad bacteriana conocida se realizaron suspensiones en PBS las cuales se administraron a ratones.

S. aureus se cultivó en caldo tripteína de soja (TSB) (Difco, Detroit, MI), en un incubador de aire con agitación rotativa a 200 rpm a 37°C (cepa salvaje) o a 28°C (mutantes termosensibles (*ts*)). Las cepas se mantuvieron en el laboratorio por pasaje en placas de agar tripteína de soja (TSA) o agar que contenía 5 % de sangre ovina (Difco). El cultivo de muestras de leche y homogenatos de glándula mamaria se realizó en placas de TSA y agar salado manitol (Difco), a 37°C (cepa parental) o a 28°C (mutantes *ts*).

Se utilizó una preparación de *S. aureus* muerto por calor como antígeno en los ensayos de ELISA (5×10^8 UFC/ml) y en los ensayos de proliferación celular (1×10^7 ó 1×10^8 UFC/ml). Para la obtención de dicha preparación, *S. aureus* se cultivó en 100 ml de caldo TSB hasta la fase exponencial tardía. Las bacterias se centrifugaron, se lavaron 3 veces con PBS y se suspendieron en 5 ml de PBS. Se realizó el recuento de UFC/ml de dicha suspensión y se calentó la misma en baño de agua a 60°C durante 1 hora. Se confirmó la mortalidad bacteriana mediante la siembra de una muestra en placas de agar sangre ovina. La preparación se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20°C. En los ensayos de ELISA y proliferación celular se utilizó asimismo un extracto de proteínas totales de *S. aureus* (10 µg/ml), el cual se preparó de acuerdo a un protocolo descrito anteriormente (84).

En los ensayos de ELISA se utilizó además como antígenos una preparación de hemolisina- α (5 µg/ml) (gentilmente proporcionada por el Dr. Sucharit Bhakdi, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany) y ácidos lipoteicoicos de *S. aureus* (5 µg/ml) (cat# L-2515, Sigma).

2.3. RATONES

Se utilizaron ratones exocriados 8 semanas de vida de la cepa Swiss. En algunos experimentos se utilizaron ratones hembra de la misma cepa durante su

primera lactancia. Los animales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y se mantuvieron bajo condiciones definidas previamente (170).

2.4. OBTENCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DE CEPAS MUTANTES TERMOSENSIBLES DE *S. aureus*

2.4.1. Mutagénesis química, enriquecimiento con antibióticos y aislamiento de mutantes termosensibles

Se obtuvieron cepas mutantes *ts* de *S. aureus* mediante un procedimiento estándar de mutagénesis química con nitrosoguanidina y subsiguiente enriquecimiento con antibióticos (105). Se utilizaron dosis mutagénicas óptimas de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (20 µg/ml a partir de un stock 3 mg/ml en acetona) (cat# M-7629, Sigma) sobre cultivos en fase logarítmica de *S. aureus* 8325-4 φ11 (D.O.: 0.35). Luego de 10 minutos a 37°C (sin agitación), el mutágeno se removió mediante 3 lavados sucesivos con solución salina, el sedimento bacteriano se diluyó en medio de cultivo y se cultivó en medio líquido durante toda la noche a la temperatura permisiva (28°C) para permitir el desarrollo de las bacterias mutantes. Los cultivos en fase logarítmica se transfirieron a la temperatura no permisiva (37°C) y 30 minutos más tarde se agregó Penicilina G (200 U/ml, Sigma) para permitir el enriquecimiento del cultivo en bacterias de fenotipo *ts*. Luego de un segundo ciclo de enriquecimiento con 30 mM D-Cicloserina (cat# 858579, Sigma), las bacterias sobrevivientes se diluyeron apropiadamente y se sembraron placas de TSA, las cuales se incubaron a 28°C. Se escogieron 360 colonias desarrolladas a 28°C, se repicaron mediante la técnica de "replica plate" y se incubaron a 28°C y 37°C para la detección de mutantes incapaces de crecer a la temperatura restrictiva.

2.4.2. Frecuencia de reversión *in vitro*

Se realizaron cultivos de las cepas *ts* A523 y B28 en 15 ml de caldo TSB hasta fase exponencial tardía (D.O.: 0.6). Los cultivos se centrifugaron y las

bacterias se suspendieron en 1.5 ml de solución salina. A partir de dicha suspensión se realizó la siembra en medio sólido. Se sembraron 0.1 ml en placas de TSA que se incubaron a 37°C (temperatura restrictiva) y 0.1 ml de la dilución 1×10^{-7} en placas de TSA que se incubaron a 28°C (temperatura permisiva). La frecuencia de reversión se calculó como el cociente entre el número de UFC desarrolladas a 37°C y el número de UFC desarrolladas a 28°C.

2.4.3. Obtención de proteínas totales y exoproductos de *S. aureus*

La extracción de proteínas totales de *S. aureus* (cepas 8325-4 ϕ 11 y A523) se realizó de acuerdo a un protocolo descrito previamente (84). Para la obtención de exoproductos de *S. aureus* se realizaron cultivos en caldo TSB a 28°C (cepas 8325-4 ϕ 11 y A523) y a 37° (cepa 8325-4 ϕ 11) hasta la fase estacionaria. Para la obtención de los exoproductos secretados por la cepa A523 a 37°C se iniciaron cultivos en TSB a 28°C (temperatura permisiva) hasta fase exponencial tardía y luego se transfirieron a 37 °C (temperatura restrictiva) hasta alcanzar la fase estacionaria. En todos los casos, los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron utilizando membranas de 0,22 micrones. Los sobrenadantes se concentraron 10 veces utilizando filtros de membranas Centricon 3 (Amicon Corp., Lexington, MA) a $2.500 \times g$, a 4°C durante 9 h y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

2.4.4. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La concentración de proteínas en las muestras se calculó en base a una curva estándar realizada con BSA.

2.4.5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo un método descrito previamente (84) para geles discontinuos conteniendo SDS. Se utilizaron las cubas y accesorios del sistema "mini-Protean II" (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) para geles pequeños de 7x8 cm. Para el armado de los geles se siguieron

las siguientes indicaciones:

Gel separador (Acrilamida 7,5% ó 10%, 0,375 M Tris-HCl, pH: 8,8)

	7,5 %	10 %
30%acrilamida/		
0,8% bisacrilamida	2,5 ml	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl pH: 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% PSA	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
H ₂ O	4,9 ml	4,9 ml
Total	10 ml	10 ml

Gel concentrador (Acrilamida 4 %, 0,125 M Tris-HCl, pH: 6,8)

	4 %
30%acrilamida/	
0,8% bisacrilamida	0,67 ml
0,5 M Tris-HCl pH: 6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
10% PSA	25 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O	3,05 ml
Total	5 ml

Para evitar la inhibición de la polimerización por contacto con el aire y obtener una interfase recta, luego de verter entre los vidrios la mezcla del gel separador, se colocó 1 ml de agua. Luego que el gel polimerizó (20 min a temperatura ambiente), se volcó el agua y se completó el armado con la mezcla correspondiente del gel concentrador y el peine elegido. Las muestras a analizar se colocaron en tubos Eppendorf, se agregó un volumen de buffer de siembra y se calentaron a ebullición durante 3 min. luego de lo cual se sembraron en el gel. La electroforesis se realizó a 30 mA por gel a temperatura ambiente en buffer de corrida.

2.4.5.1. Tinción de los geles con Coomassie-blue

Para observar el perfil proteico de las muestras luego de la migración, se incubó el gel en solución de tinción durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave y se destiñó incubando de la misma manera en solución decolorante hasta la visualización de las bandas. Para su conservación, el gel se colocó sobre un papel de filtro Whatman 3MM, se cubrió con una lámina de celofán y se secó utilizando un secador de geles (Bio Rad) a 80° C durante 2 h.

2.4.5.2. Patrones de peso molecular

Se utilizaron marcadores de peso molecular pre-teñidos, abarcando el rango de 27.000-180.000 Daltons (Prestained kit protein Molecular Weight, cat# MW-SDS-BLUE, Sigma). Se prepararon según la indicación de los fabricantes, y se emplearon 5 µl/calle.

2.4.6. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀)

Se inocularon grupos de 10 ratones por la ruta intraperitoneal (*ip*) con *S. aureus* 8325-4 φ11 o su derivado *ts* A523 en solución salina que contenía mucina gástrica al 5%. Se administraron diluciones seriadas al décimo entre 10⁶ y 10⁹ UFC por ratón. Se registró la mortalidad de los ratones durante 7 días y se determinó la DL₅₀ de acuerdo al método de Reed-Muench recientemente revisado por Welkos y O'Brien (181).

2.4.7. Evaluación inmunológica de la cepa A523 en un modelo de infección sistémica

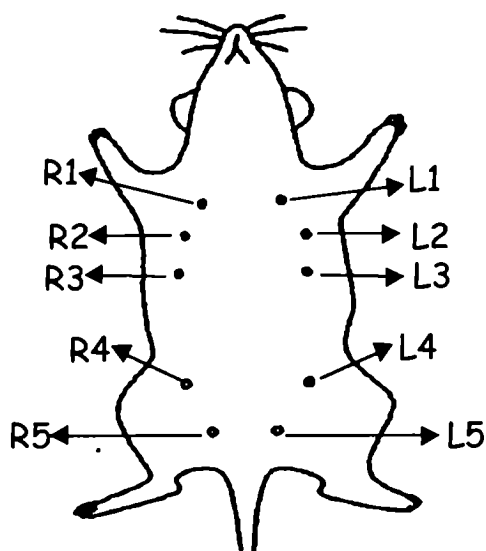
Se evaluó la inmunogenicidad de la cepa viva atenuada A523 de *S. aureus* (CVA A523) luego de ser administrada por la ruta *ip*. Se inmunizaron grupos de 8-10 ratones Swiss de 6-8 semanas de vida por la ruta *ip* con la CVA A523. Se administraron 3 inoculaciones de la CVA A523, a intervalos de 7 días, controlándose diariamente el peso y el estado general de cada animal, tanto inmunizados como

controles (inoculados con solución salina). Siete días luego de cada inoculación se obtuvo plasma de los ratones control e inmunizados, el cual fue posteriormente utilizado para la determinación de anticuerpos específicos. Siete días luego de la tercer inoculación, se desafiaron los ratones por la ruta *ip* con 35 DL₅₀ de la cepa virulenta parental. Se registró la mortalidad en los grupos de ratones control e inmunizados.

2.5. EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE LA CVA A523 DE OTORGAR PROTECCION EN LA GLANDULA MAMARIA E INDUCIR INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR

2.5.1. Inoculación intramamaria (*Ima*)

Para la realización de la inmunización o el desafío *Ima*, grupos de ratones hembra se anestesiaron con pentobarbital (131) y se inocularon con la CVA A523 (5×10^6 UFC) o la cepa *S. aureus* 8325-4 ϕ 11 (5×10^4 - 5×10^7 UFC) en un volumen de 50 μ l, en las glándulas número 4 (izquierda, L4 y derecha, R4, Esquema 1) de acuerdo a un protocolo descrito previamente (27). Las glándulas L4 se utilizaron para estudios bacteriológicos y las glándulas R4 para estudios histológicos. En los experimentos cuya duración excedió el período de lactancia, se colocaron crías pequeñas para mantener las glándulas activas.



Esquema 1. Ubicación de las glándulas mamarias en el ratón.

2.5.2. Recuperación de *S. aureus* a partir de homogenatos de la glándula mamaria

Las glándulas fueron homogeneizadas en 2 ml de agua destilada estéril y se sembraron diluciones seriadas de los homogenatos en placas de agar salado manitol (medio selectivo y diferencial para *S. aureus*) y TSA para recuento cuantitativo. A partir de las UFC desarrolladas se calculó el número total de UFC recuperadas de cada glándula a cada uno de los tiempos analizados.

2.5.3. Estudios inmunohistoquímicos

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron utilizando el método de estreptoavidina-biotina-peroxidasa (DAKO StreptABComplex/HRP Duet, cat#K492, Dako, Denmark). Se realizó el siguiente protocolo a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina:

- Sumergir los cortes en Xilol durante 20 min. (desparafinización y rehidratación).
- Colocar los cortes unos minutos en alcohol 100%, 96% y 70% sucesivamente.
- Colocar los cortes en peróxido de hidrógeno 3% en metanol durante 20 min. (bloqueo de la peroxidasa endógena).
- Bloquear con suero normal de cabra al 5% en TBS durante 20 min.
- Incubar con el anticuerpo primario diluido (1/500) en TBS-suero durante 30 min.
- Lavar con TBS 5 min.
- Incubar con el anticuerpo anti-conejo conjugado con biotina (1/100) durante 30 min.
- Lavar con TBS 5 min.
- Incubar con la solución streptABComplex/HRP durante 30 min.
- Lavar con TBS 5 min.
- Incubar con el sustrato cromogénico 3,3'-Diaminobenzidina durante 5-15 min.
- Detener la reacción con agua destilada.
- Teñir 2 min. con hematoxilina.
- Sumergir sucesivamente en alcohol 96%, 100% y Xilol y montar.

Anticuerpos utilizados:

- Anticuerpo de conejo específico anti-IgA murina, cat#401141, Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA.
- Anticuerpo de conejo específico anti-IgG murina, cat#64-360, ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA.

2.5.4. Obtención de muestras de leche

La leche se obtuvo por succión utilizando una bomba manual para animales de laboratorio adaptando un diseño descrito previamente (165). Las crías se separaron de sus madres 2 horas antes de recolectar las muestras para permitir la acumulación de leche en las glándulas. Los ratones hembra se anestesiaron con pentobarbital y recibieron 6 U de ocitocina (cat# O-2882, Sigma) por la ruta *ip* (Comunicación personal, Oleg Larinov, Moscú, CEI). Quince minutos más tarde se recolectó leche de las glándulas L4 y R4 la cual fue utilizada para estudios bacteriológicos, citológicos o inmunológicos.

2.5.5. Recuperación de *S. aureus* a partir de muestras de leche

Para los estudios bacteriológicos, la leche se recolectó en tubos estériles y se realizaron cultivos duplicados a 28°C y 37°C en agar salado manitol previo enriquecimiento en caldo TSB durante 18 horas (20 µl de leche en 2 ml de caldo).

2.5.6. Recuento de células somáticas en leche

Para la realización del recuento celular, la leche se recolectó en tubos con anticoagulante (EDTA 5%) y luego de medir el volumen de leche obtenido a partir de las 2 glándulas (L4 y R4), la leche se diluyó en PBS (1/5) y se centrifugó a 2000 rpm (HERMLE Z 233 MK) a 4°C durante 5 min. Las células fueron recuperadas y suspendidas en un volumen apropiado de PBS. Posteriormente se realizó el recuento de las células en forma manual utilizando una cámara de Neubauer. Una porción de la suspensión celular se citocentrifugó y los preparados se tiñieron con la coloración de Giemsa a fin de realizar el recuento diferencial de células.

2.5.7. Determinación de anticuerpos en plasma y leche

Se determinaron los niveles de anticuerpos específicos IgG e IgA anti-*S. aureus* (bacteria completa o antígenos purificados) en plasma y leche mediante ELISA (151). El plasma se obtuvo a partir de sangre extraída del seno retroorbital de

los ratones. Las muestras de plasma individuales se mantuvieron a -20°C hasta el momento de realizar el ensayo. La leche se extrajo según se describió en el ítem 2.5.4. Luego de obtenidas las muestras, las mismas se diluyeron al quinto en PBS y se centrifugaron a 14000 rpm (HERMLE Z 233 MK) a 4°C para remover los restos celulares. Los sobrenadantes se conservaron a -20°C hasta su utilización. El ELISA se realizó de acuerdo al siguiente protocolo:

- Colocar la preparación de antígeno diluida en buffer bicarbonato en placas de 96 pocillos (fondo plano, cat# 25880-96, Corning Glass Works, Corning, NY) e incubar a 4°C durante toda la noche.
- Lavar una vez con PBS-Tween.
- Colocar 100 μl de solución de bloqueo por pocillo e incubar 30 min. a 37°C .
- Lavar 2 veces con PBS-Tween.
- Agregar 50 μl de la muestra e incubar 60 min. a 37°C .
- Lavar 3 veces con PBS-Tween.
- Colocar 50 μl de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado a fosfatasa alcalina e incubar 60 min. a 37°C .
- Lavar 3 veces con PBS-Tween.
- Agregar 100 μl de sustrato e incubar 15-30 min. a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia a 405 nm.

Sustrato: p-nitrofenil-fosfato (cat# N9389, Sigma).

Anticuerpos utilizados:

- Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (cat# A-4312, Sigma), diluido 1/1000 en solución diluyente.
- Anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (cat# A-4937, Sigma), diluido 1/1500 en solución diluyente.

2.5.8. Obtención de células mononucleares

Se obtuvieron células mononucleares a partir de los ganglios drenantes de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados forzando el tejido a pasar a través de una malla de acero y luego a través de una aguja 26G. Las células se lavaron por centrifugación con medio RPMI-SFB 2%.

2.5.9. Ensayos de proliferación *in vitro*

Las células provenientes de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria se resuspendieron en medio RPMI 1640 adicionado con buffer

HEPES 25 mM (cat# 22400, Life Technologies), SFB 10% (cat# 16000, Life Technologies), L-Glutamina 2 mM (cat# 25030, Life Technologies), 2- β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M (Sigma), piruvato de sodio 0,1 mM (cat# 11840-030, Life Technologies), aminoácidos esenciales (MEM 1X, cat# 11130-051, Life Technologies), aminoácidos no esenciales (MEM 0,5 X, cat# 11140-050, Life Technologies), Gentamicina 50 μ g/ml (cat# G-1264, Sigma) y Penicilina G (200 U/ml) (cat# P-3032, Sigma). Las células (2×10^5 en 200 μ l) se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo en U (Corning Glass Works) en presencia de diferentes antígenos de *S. aureus*. Los cultivos control se realizaron en presencia de medio solo o medio que contenía Concanavalina A 2 μ g/ml (Con A, cat# C-5275, Sigma). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%. La proliferación celular se determinó por el agregado de ³H-Timidina (1 μ Ci/well) durante las últimas 16 horas de cultivo y posterior detección de la Timidina incorporada en contador de centelleo líquido.

2.5.10. Detección de antígenos de superficie

Células mononucleares frescas provenientes de los ganglios drenantes de la glándula mamaria (obtenidas como se explica en el ítem 2.5.8) o las células obtenidas luego del cultivo *in vitro* con *S. aureus* se resuspendieron en buffer FACS. Los antígenos linfocitarios de superficie de ratón fueron detectados utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales:

Anticuerpo	Fluorocromo	Proveedor	Cat #
Anti-CD3	FITC o TC	CALTAG	HM3401, HM3406
Anti-CD4	FITC o PE	CALTAG	RM2501, RM2504
Anti-CD8	TC	CALTAG	RM2206
Anti-CD25	PE	CALTAG	RM6004
Pan NK DX5	PE	BD Pharmingen	553858
Anti-CD25	Biotina	BD Pharmingen	01092A
Anti-receptor T $\gamma\delta$	Biotina	BD Pharmingen	01312D

La unión no específica se evaluó con anticuerpos contra antígenos irrelevantes. Las células se incubaron durante 20 min. en la oscuridad a 4°C y luego se lavaron con buffer FACS. En los casos en que se utilizaron anticuerpos

biotinilados, las células se incubaron durante 30 min. a 4°C con Streptavidina-TC (CALTAG, South San Francisco, CA). Finalmente, las células se resuspendieron en buffer FACS y se fijaron en paraformaldehído 1% (a partir de un stock al 4% en PBS). En otros experimentos, previo a la marcación, las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C en presencia de suero normal de ratón con el fin de bloquear posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo coulter EPICS XL (Miami, FL). Los resultados se analizaron por medio del programa XL II.

2.5.11. Detección de citoquinas por ELISA

Se determinaron los niveles de IL-4 y de IFN- γ en el sobrenadante de los cultivos celulares. La concentración de IFN- γ se determinó mediante el MiniKit para la detección de IFN- γ de ratón (cat# KM-IFNG, ENDOGEN, Woburn, MA). El protocolo sugerido por los fabricantes se modificó brevemente (49) y se describe a continuación:

- Colocar el anticuerpo anti-IFN- γ de ratón (100 μ l/pocillo) diluido según las indicaciones del fabricante, en buffer bicarbonato en placas de 96 pocillos (fondo plano, cat# 25880-96, Corning Glass Works, Corning, NY.) e incubar a 4°C durante toda la noche.
- Aspirar el anticuerpo.
- Colocar 200 μ l de solución de bloqueo por pocillo e incubar 60 min. a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar 3 veces con 200 μ l/pocillo de PBS-BSA-Tween.
- Agregar 50 μ l de la muestra e incubar 3 h a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA-Tween.
- Colocar 100 μ l de anticuerpo anti-IFN- γ de ratón biotinilado diluido según las instrucciones del fabricante en solución de bloqueo e incubar 60 min. a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA-Tween.
- Colocar 50 μ l/pocillo de Estreptoavidina-Peroxidasa diluida 1/3000 en solución de bloqueo (S-5512, 1 mg/ml en PBS, Sigma) e incubar 90 min. a temperatura ambiente con agitación.
- Lavar 3 veces con PBS-BSA-Tween.
- Agregar 50 μ l/pocillo de sustrato e incubar 30-60 min. a temperatura ambiente con agitación.
- Leer la absorbancia a 405 nm.

Sustrato:2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)–peróxido de hidrógeno (cat# A1818, Sigma)

La concentración de IL-4 se determinó mediante el Kit DuoSet para la detección de IL-4 de ratón (cat# 80-3537-00, Genzyme, Cambridge, MA) de acuerdo al protocolo sugerido por los fabricantes.

Se realizó la determinación cuantitativa de las citoquinas secretadas al medio extracelular por comparación con las curvas estándar obtenidas con las citoquinas recombinantes provistas por ambos kits (Genzyme, Endogen). El límite de sensibilidad de ambos ensayos fue de 40 pg/ml.

2.5.12. Detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo

Las células de los ganglios drenantes de la glándula mamaria inmediatamente luego de ser obtenidas o previo cultivo en presencia de *S. aureus* se incubaron durante 10 h en presencia de Monensina (GolgiStop, Cytofix/ Cytoperm Plus, CytoStain Kits, cat# 2076KK, BD Pharmingen, San Diego, CA) para desagregar el complejo de Golgi y permitir la acumulación de las proteínas intracelulares. Las células fueron recuperadas por centrifugación, lavadas en buffer FACS y se realizó la marcación para antígenos de superficie como se describió en el ítem 2.5.10. Posteriormente se realizó la técnica de detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo (42, 134). Para ello, las células se incubaron con la solución Cytofix/Cytoperm (cat# 2090 KZ, BD Pharmingen) durante 20 min. a 4°C, se lavaron en solución Perm/Wash (cat# 2091 KZ, BD Pharmingen) y se incubaron con los anticuerpos anti-citoquinas durante 30 min. a 4°C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

Anticuerpo	Fluorocromo	Proveedor	Cat#
Anti-IFN- γ	FITC	BD Pharmingen	554411
Anti-IL4	PE	BD Pharmingen	18195A

La unión no específica se evaluó con anticuerpos contra antígenos irrelevantes. Las células se lavaron con solución Perm/Wash y luego con buffer

FACS para permitir el cierre de la membrana. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo coulter EPICS XL y los resultados se analizaron por medio del programa XL II.

2.6. CONSIDERACIONES ESTADISTICAS

Los datos de muestras con distribución normal se analizaron por medio del Test T de Student. Los datos de muestras sin distribución normal se analizaron mediante el contraste de la suma de rangos de Mann-Whitney (muestras independientes) o de Wilcoxon (muestras pareadas). Las comparaciones estadísticas se realizaron con el programa Graph Pad (PRISM, versión 2.2). Para la comparación estadística de proporciones se utilizó el Test exacto de Fisher del paquete estadístico EPISTAT. En todos los casos, los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

3. Resultados

3.1. MUTANTES de *S. aureus* ATENUADAS POR TERMOSENSIBILIDAD

3.1.1. Obtención y caracterización de cepas termosensibles

Se realizó la mutagénesis química con nitrosoguanidina de la cepa 8325-4 ϕ 11 de *S. aureus* y se evaluó el desarrollo en medio sólido a 28°C y 37°C de 360 colonias obtenidas luego de la mutagénesis y el posterior enriquecimiento con antibióticos. En base al desarrollo en medio sólido se seleccionaron 6 cepas mutantes con fenotipo termosensible (*ts*), capaces de replicar a 28°C pero no a 37°C. Las curvas de crecimiento en medio líquido de la cepa parental (8325-4 ϕ 11) y de las 6 cepas *ts* se muestra en la Fig. 1. Dos de las 6 cepas mutantes analizadas, las cepas A523 y B28, presentaron fenotipo “coasting” o de replicación limitada, es decir que continuaban replicándose por un número limitado de generaciones al ser transferidas a la temperatura no permisiva (37°C), para luego cesar su duplicación. Las otras 4 cepas mutantes, en cambio, presentaron fenotipo “leaky” o replicante, es decir que continuaron replicándose a la temperatura no permisiva con una velocidad de duplicación menor, pero sin cesar su desarrollo dentro del período en que se evaluaron. Se comprobó mediante pruebas convencionales de tipificación que las cepas *ts* obtenidas eran *S. aureus*.

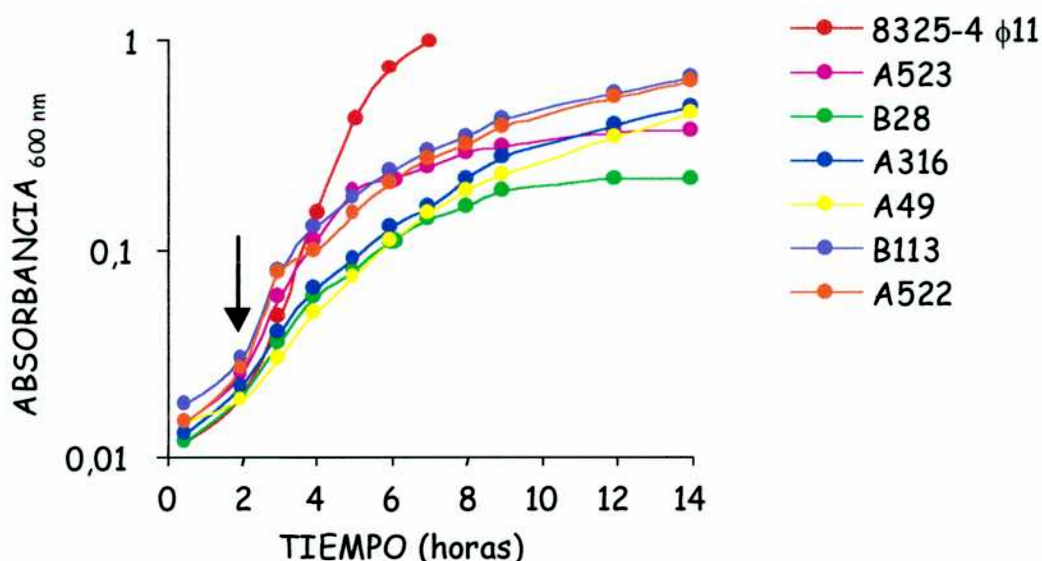


Figura 1. Curva de crecimiento de *S. aureus* 8325-4 ϕ 11 y sus derivados *ts*. Los cultivos se iniciaron a 28°C y luego se transfirieron a 37°C (flecha).

3.1.2. Frecuencia de reversión de las mutantes *ts*

Se escogieron para ulteriores estudios las 2 cepas con fenotipo "coasting" a las que se evaluó su frecuencia de reversión *in vitro*. Para ello, las cepas *ts* A523 y B28 se cultivaron en medio líquido a 28°C hasta alcanzar la fase exponencial tardía. A partir de cada uno de los cultivos en medio líquido se realizaron cultivos en medio sólido a 37°C (temperatura restrictiva) y a 28°C (temperatura permisiva). A partir del número de UFC desarrolladas a cada temperatura se determinó la frecuencia de reversión de las mutantes *ts*. La frecuencia de reversión de la cepa B28 fue 2×10^{-7} , mientras que la frecuencia de reversión de la cepa A523 fue 7×10^{-9} . Se decidió realizar este trabajo de investigación con la cepa mutante *ts* A523 por presentar una frecuencia de reversión menor que la de la cepa B28. El desarrollo en medio sólido de la cepa A523 a 28°C y 37°C se muestra en la Fig. 2. El tiempo medio de duplicación en medio líquido a 28°C de la cepa *ts* A523 fue igual al de la cepa parental a esa temperatura.



Figura 2. Desarrollo en medio sólido de la cepa *ts* A523. A: Desarrollo a 37°C (temperatura restrictiva); B: desarrollo a 28°C (temperatura permisiva).

3.1.3. Caracterización del perfil de proteínas totales y exoproductos de la mutante *ts* A523

Se analizó el perfil de proteínas totales de la cepa *ts* A523 y de la cepa parental 8325-4 ϕ 11 por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). El perfil proteico de la mutante *ts* fue idéntico al de la cepa virulenta parental (Fig. 3 A). Asimismo, se caracterizó el perfil de exoproductos secretados por la mutante *ts* en comparación con la cepa parental. Para ello, se obtuvieron las proteínas secretadas en el medio de cultivo, luego de crecer las cepas 8325-4 ϕ 11 y A523 a 28°C y 37°C y se analizaron por SDS-PAGE. Se observó que durante el período en que la cepa A523 fue capaz de replicar a la temperatura restrictiva (37°C), ésta secretó los mismos exoproductos que la cepa parental (Fig. 3 B, calles 1 y 3). La secreción de exoproductos no difirió entre ambas cepas cuando se las cultivó a 28°C (Fig. 3 B, calles 2 y 4).

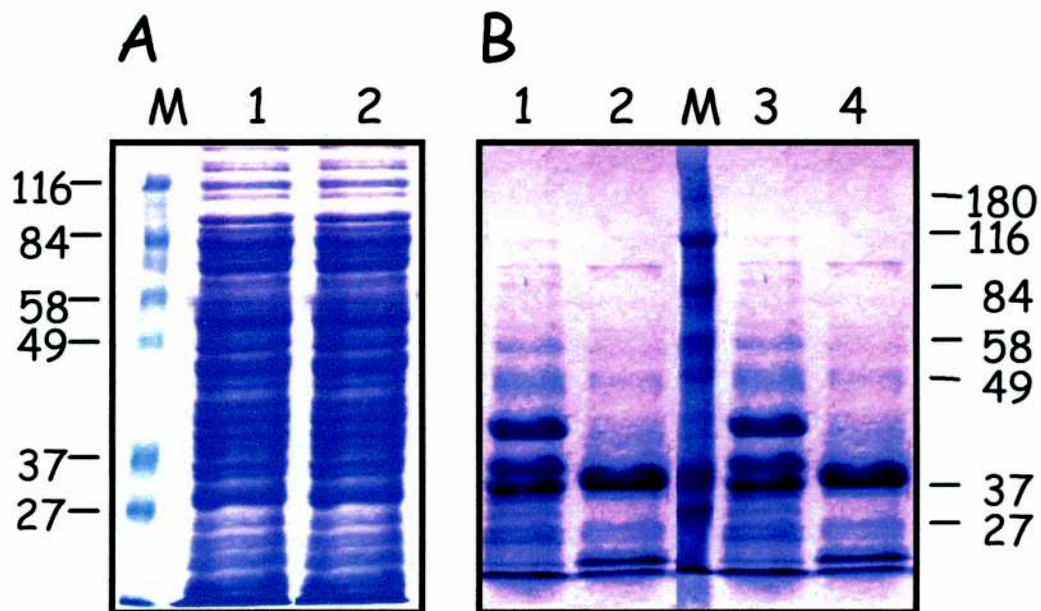


Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE de los perfiles proteicos y los exoproductos de la mutante *ts* A523 y la cepa parental 8325-4 ϕ 11. A: Los extractos de proteínas totales (15 µg) de las cepas 8325-4 ϕ 11 (calle 1) y de la mutante *ts* A523 (calle 2), se separaron mediante SDS-PAGE (7,5 %). B: Los exoproductos secretados por la cepa 8325-4 ϕ 11 cultivada a 37°C (calle 1) y 28°C (calle 2) y por la cepa *ts* A523 cultivada a 37°C (calle 3) y 28°C (calle 4), se separaron mediante SDS-PAGE (10%). Calle M: marcadores de peso molecular.

3.1.4. Conclusiones parciales

Se obtuvo una mutante *ts* de *S. aureus* (A523) de fenotipo “coasting” o de replicación limitada, con una frecuencia de reversión *in vitro* lo suficientemente baja como para permitir su utilización en estudios inmunológicos en animales de laboratorio. Asimismo, el perfil de exoproductos secretados por la cepa A523 durante el cultivo *in vitro* coincidió con el de la cepa virulenta parental. Dicha cepa se utilizó en este trabajo como cepa viva atenuada prototípica de *S. aureus* (CVA A523) y no constituye una cepa vacuna definitiva.

3.2. CARACTERIZACION DE LA MUTANTE *ts* A523 DE *S. aureus* EN UN MODELO MURINO DE INFECCION SISTEMICA

3.2.1 Atenuación de la cepa mutante *ts* A523

A fin de evaluar *in vivo* su grado de atenuación, se determinó la DL_{50} de la cepa mutante A523 en comparación con la de la cepa virulenta parental 8325-4 $\phi 11$. Para ello, se inocularon grupos de ratones por la ruta intraperitoneal (*ip*) con diferentes dosis de las cepas *S. aureus* 8325-4 $\phi 11$ o *S. aureus* A523 en solución salina que contenía mucina gástrica al 5%. Se registró la mortalidad en los diferentes grupos de ratones durante 7 días y se determinó la DL_{50} para cada cepa. La cepa *ts* A523 resultó atenuada al ser administrada por la ruta *ip*, dado que su DL_{50} superó en casi dos órdenes de magnitud la DL_{50} de la cepa virulenta parental (Tabla 1).

Tabla 1. Atenuación *in vivo* de la cepa *ts S. aureus* A523

CEPA	DL_{50} (UFC/ratón)
<i>S. aureus</i> 8325-4 $\phi 11$	2.7×10^7
<i>S. aureus</i> A523	1×10^9

3.2.2. Efecto de la inmunización *ip* con la CVA A523 sobre la generación de anticuerpos específicos en plasma

Se evaluó la capacidad de la CVA A523 de inducir anticuerpos específicos en plasma luego de ser administrada por la ruta *ip*. Se inmunizaron grupos de ratones por la ruta *ip*, mediante 3 inoculaciones espaciadas 7 días entre sí que contenían 10^8 UFC de la CVA A523 en 0.2 ml de solución salina. Siete días luego de cada inoculación, se determinaron los niveles de anticuerpos anti-*S. aureus* de tipo IgG en el plasma de los ratones inoculados con solución salina (control) e inmunizados (Fig. 4). Se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de anticuerpos específicos en el plasma de los ratones inmunizados con respecto a los ratones control luego de dos inoculaciones de la CVA A523 por la ruta *ip*. La tercera inoculación indujo un aumento aún mayor en los niveles de IgG plasmática anti-*S. aureus* (Fig. 4).

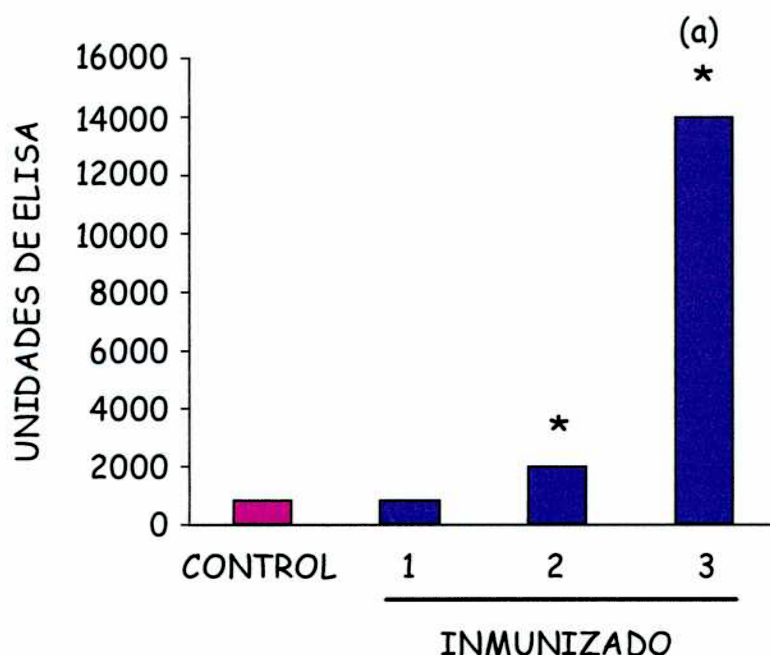


Figura 4. Efecto de la inmunización *ip* con la CVA A523 sobre los niveles de anticuerpos específicos anti-*S. aureus*. Cada barra representa la mediana de las unidades de ELISA determinadas para cada grupo. Las barras azules indican los niveles de anticuerpos en ratones inmunizados luego de 1, 2 ó 3 inoculaciones. (*): $p < 0.05$, (a): $p < 0.05$, comparado con los niveles de anticuerpos alcanzados luego de 2 inoculaciones, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney. Unidades de ELISA: $A_{405} \times \text{dil}^{-1} \times 100$.

3.2.3. Efecto de la inmunización *ip* con la CVA A523 en la protección frente al desafío con *S. aureus*

Posteriormente, se evaluó la capacidad de la inmunización con la CVA A523 para otorgar protección frente al desafío con la cepa virulenta de *S. aureus*. Se inmunizaron grupos de ratones por la ruta *ip* con la CVA A523 siguiendo el esquema descrito en el ítem anterior. Siete días luego de la última inoculación, los ratones se desafiaron por la ruta *ip* con 35 DL₅₀ de la cepa virulenta parental y se registró su sobrevivencia durante 7 días. Se observó un aumento significativo ($p < 0.01$) en la sobrevivencia de los ratones inmunizados frente al desafío con la cepa parental con respecto al grupo control (Fig. 5).

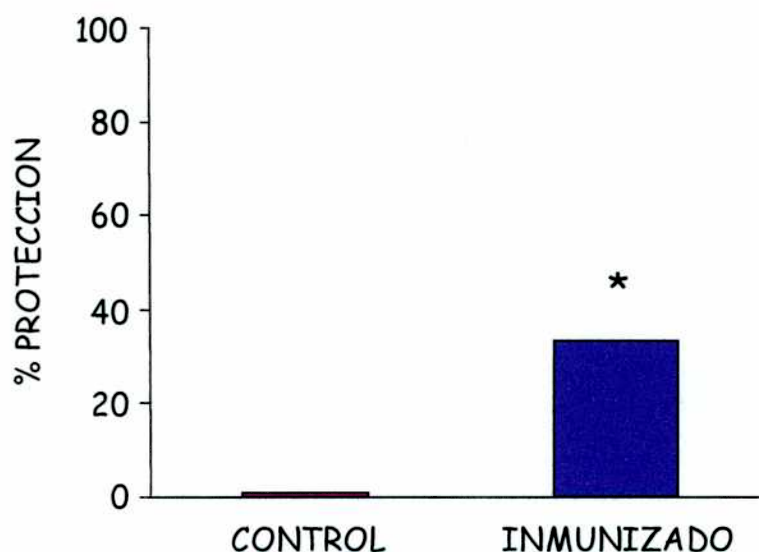


Figura 5. Protección otorgada por la inmunización con la CVA A523 frente al desafío con *S. aureus*. El porcentaje de protección se determinó como el porcentaje de ratones sobrevivientes al día 7 luego del desafío. (*): $p < 0.01$, Test de Fisher.

3.2.4. Conclusiones parciales

Estos resultados permitieron determinar la atenuación de la cepa *ts* A523 en un modelo murino de infección sistémica. Asimismo, la inmunización por la ruta *ip* con la CVA A523 otorgó protección frente al desafío con la cepa virulenta parental, lo cual se correlacionó con la presencia de elevados niveles de anticuerpos en el plasma de los ratones inmunizados. Los resultados obtenidos acerca de la atenuación, inmunogenicidad y capacidad protectora de la CVA A523 indicaron la

factibilidad de utilizar dicha mutante como cepa vacunal prototípica en los subsiguientes estudios en la glándula mamaria.

3.3. INFECCION INTRAMAMARIA EXPERIMENTAL POR *S. aureus* 8325 ϕ 11

El modelo murino de infección aguda de la glándula mamaria fue utilizado previamente para el estudio de los factores de virulencia involucrados en la patogénesis de las infecciones intramamarias (*Ima*) (73, 95). Sin embargo, hasta el momento, este modelo se utilizó sin considerar la persistencia de *S. aureus* en la glándula por largos períodos, tal como ocurre durante la infección natural en bovinos. Por este motivo y considerando que las características de la infección *Ima* pueden depender de la cepa de *S. aureus* utilizada, en este trabajo se estableció un modelo murino de infección *Ima* por la cepa 8325 ϕ 11 de *S. aureus* a partir del modelo de infección aguda descrito previamente (27).

3.3.1. Estudios bacteriológicos

Se desafiaron grupos de ratones hembra en su primera lactancia por la ruta *Ima* el día 14 post-parto con 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 ó 5×10^7 UFC de la cepa virulenta de *S. aureus* en las mamas número 4 (L4 y R4, Esquema 1 en M&M). A diferentes tiempos luego del desafío (1, 4, 6, 10, 14 y 21 días) se extirparon las glándulas y las laterales izquierdas (L4) se homogeneizaron para la realización de recuentos bacteriológicos. Se observó una escasa recuperación de *S. aureus* a partir de la glándula mamaria de ratones desafiados con 5×10^4 UFC. Por el contrario, los ratones desafiados con 5×10^6 , ó 5×10^7 UFC presentaron formación de abscesos con zonas de necrosis en las mamas inoculadas. En ratones desafiados con 5×10^5 UFC, no se observaron zonas de necrosis en las glándulas inoculadas y pudo recuperarse *S. aureus* a partir de homogenatos de las glándulas. La cinética de recuperación de *S. aureus* en homogenato de glándula mamaria de los ratones inoculados con 5×10^5 UFC se observa en la Fig. 6. La línea punteada indica el inóculo administrado. Los resultados indicaron que podía recuperarse *S. aureus* de la glándula mamaria hasta 21 días luego del desafío *Ima*. A las 24 h post-desafío el número promedio de bacterias recuperadas fue de 10^6 UFC por glándula. Hasta

los 6 días luego del desafío se recuperó prácticamente el número de bacterias inoculadas, mientras que a los 10 días, el número de bacterias disminuyó significativamente ($p < 0.001$) a 150 UFC/mama, disminución que continuó a los 14 y 21 días post-desafío.

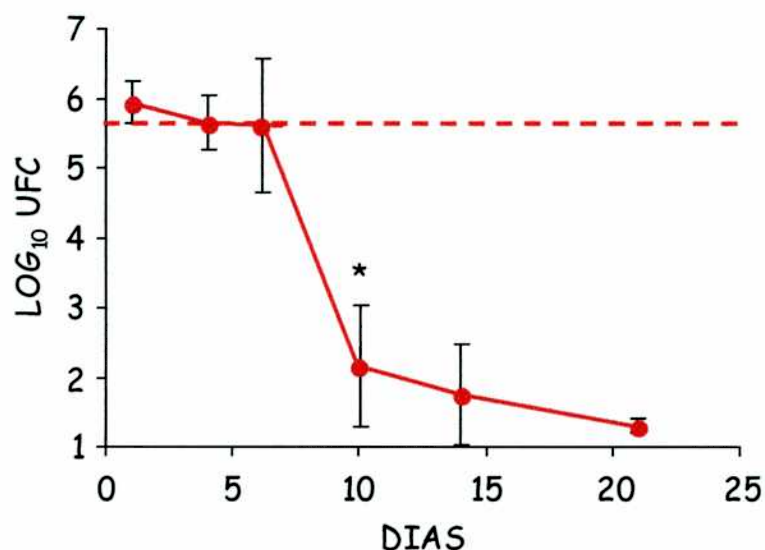


Figura 6. Permanencia de *S. aureus* en la glándula mamaria luego del desafío *Ima*. Cada punto representa la media del $\log_{10}$ de las UFC recuperadas de 8-10 glándulas. La línea punteada indica el inóculo administrado. (*): $p < 0.001$, Test *t* de Student.

3.3.2. Estudios histológicos

Para la realización de los estudios histológicos se utilizaron las glándulas laterales derechas (R4) de ratones desafiados con 5×10^4 ó 5×10^5 UFC de *S. aureus* y de ratones que recibieron solución salina por la ruta *Ima*. Los resultados de los estudios histológicos se muestran en las Figs. 7 y 8. A las 24 h luego del desafío se observó un infiltrado inflamatorio leve y difuso de tipo polimorfonuclear en el parénquima mamario y en el intersticio, asociado a la movilización intravascular de leucocitos polimorfonucleares (Fig. 7 C). La intensidad del infiltrado fue la misma, independientemente de la dosis de *S. aureus* inoculada. Dicho infiltrado aumentó en intensidad hacia las 96 h luego del desafío con *S. aureus* (Fig. 7 D). A los 6 días luego del desafío bacteriano se observó mayor infiltrado inflamatorio, predominantemente mononuclear, y en menor medida polimorfonuclear, cuya intensidad fue mayor en ratones que recibieron 5×10^5 UFC de *S. aureus* (Fig. 8 A).

La distribución del infiltrado fue intersticial y en menor medida intraparenquimatosa. A los 10 días post-desafío el infiltrado fue aún más intenso (en ratones inoculados con 5×10^5 UFC de *S. aureus*) y de tipo linfoplasmocitario, con la presencia de escasos leucocitos polimorfonucleares (Fig. 8 B). A los 14 días se observaron 2 tipos de lesiones. En algunos casos se vio formación de abscesos e infiltrado inflamatorio polimorfonuclear y linfoplasmocitario difuso intersticial e intraparenquimatoso (Fig. 8 C), mientras que en otros ratones se detectaron lesiones no abscedadas, con infiltrado de células mononucleares. Finalmente, 21 días luego del desafío *Ima* con *S. aureus*, el infiltrado inflamatorio disminuyó marcadamente, quedando limitado a escasas células mononucleares y algunos leucocitos polimorfonucleares intersticiales (Fig. 8 D). A este tiempo, no se observaron diferencias significativas con respecto a las glándulas de ratones inoculados con solución salina.

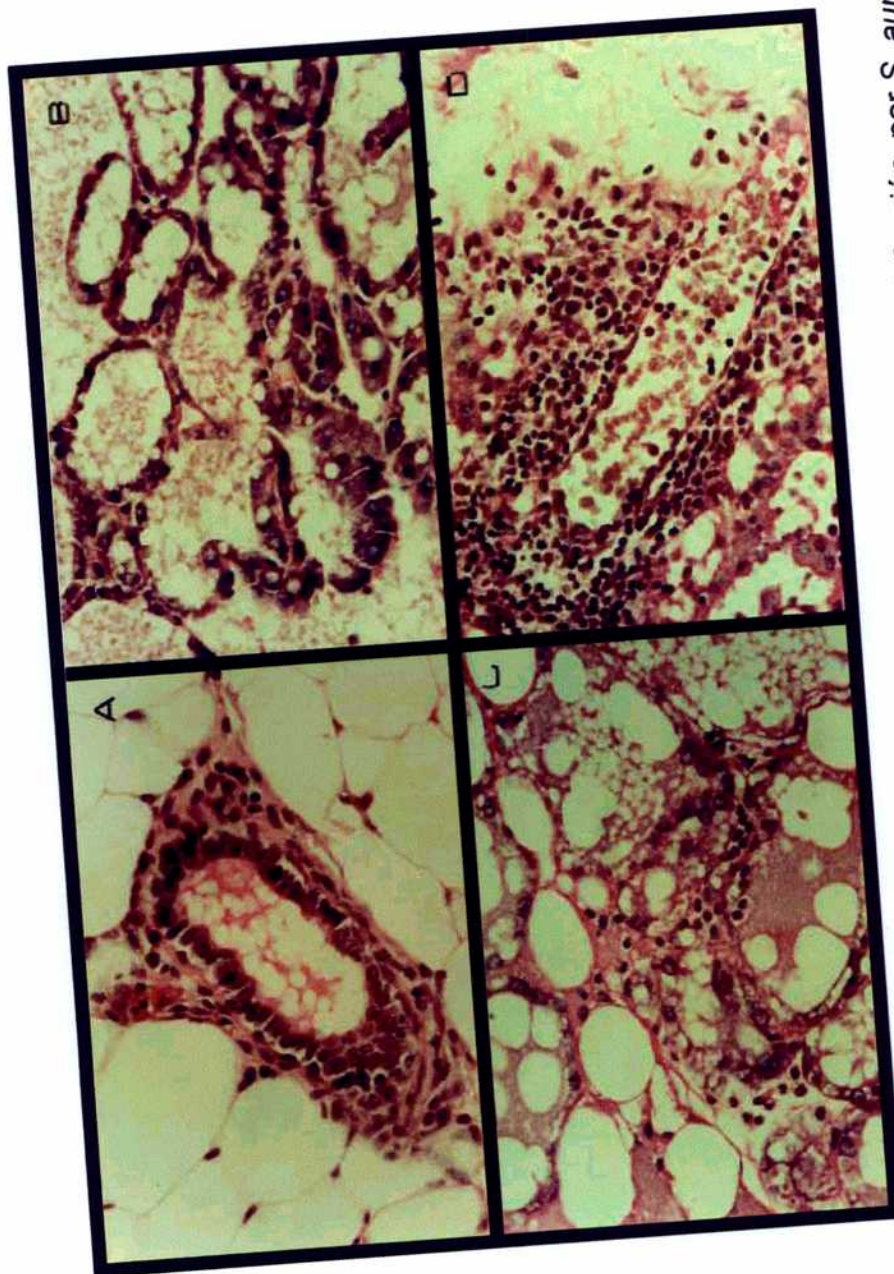


Figura 7. Estudios histológicos de la glándula mamaria durante la infección por *S. aureus*
 A: sección de glándula mamaria no desarrollada (ratón hembra no lactante); B: sección de glándula mamaria activa de un ratón control (inoculado con solución salina); C-D: secciones de glándula mamaria 24 h y 96 h post-desafío *Ima* con *S. aureus*, respectivamente.

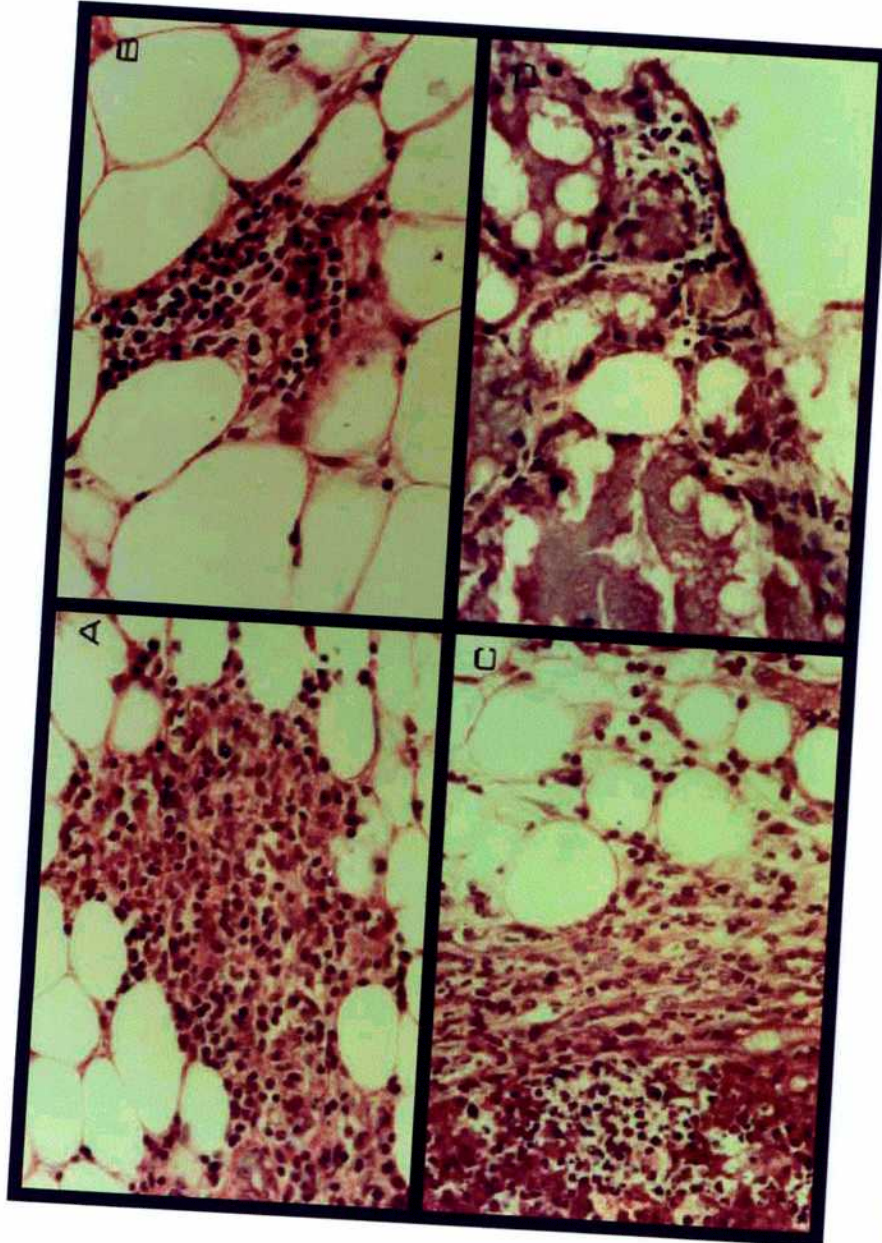


Figura 8. Estudios histológicos de la glándula mamaria durante la infección por *S. aureus* 8325-4 ϕ 11. A, B, C, D: secciones de glándula mamaria a los 6, 10, 14 y 21 días post-desafío *Ima* con *S. aureus*, respectivamente.

Paralelamente a los estudios histológicos, se realizaron estudios de inmunomarcación para la detección de plasmocitos secretores de IgA diferenciados en respuesta a la infección por *S. aureus*. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figs. 9 y 10. No se observaron células con marcación positiva en ratones control (inoculados con solución salina) (Fig. 9 A), mientras que a las 24 h luego del desafío con *S. aureus* se observó un pequeño número de plasmocitos secretores de IgA (Fig. 9 B). El número de plasmocitos secretores de IgA aumentó hacia los 10 y 21 días luego de la inoculación bacteriana (Figs. 9 C y D respectivamente) con respecto a lo observado a dichos tiempos en ratones control. En la Fig. 10 se observa la presencia de varios plasmocitos en los alvéolos (A) y en el nódulo linfático drenante (B) 14 días luego del desafío *Ima*. Asimismo, se detectaron plasmocitos secretores de IgG en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria a los 21 días luego del desafío *Ima* (resultados no mostrados).

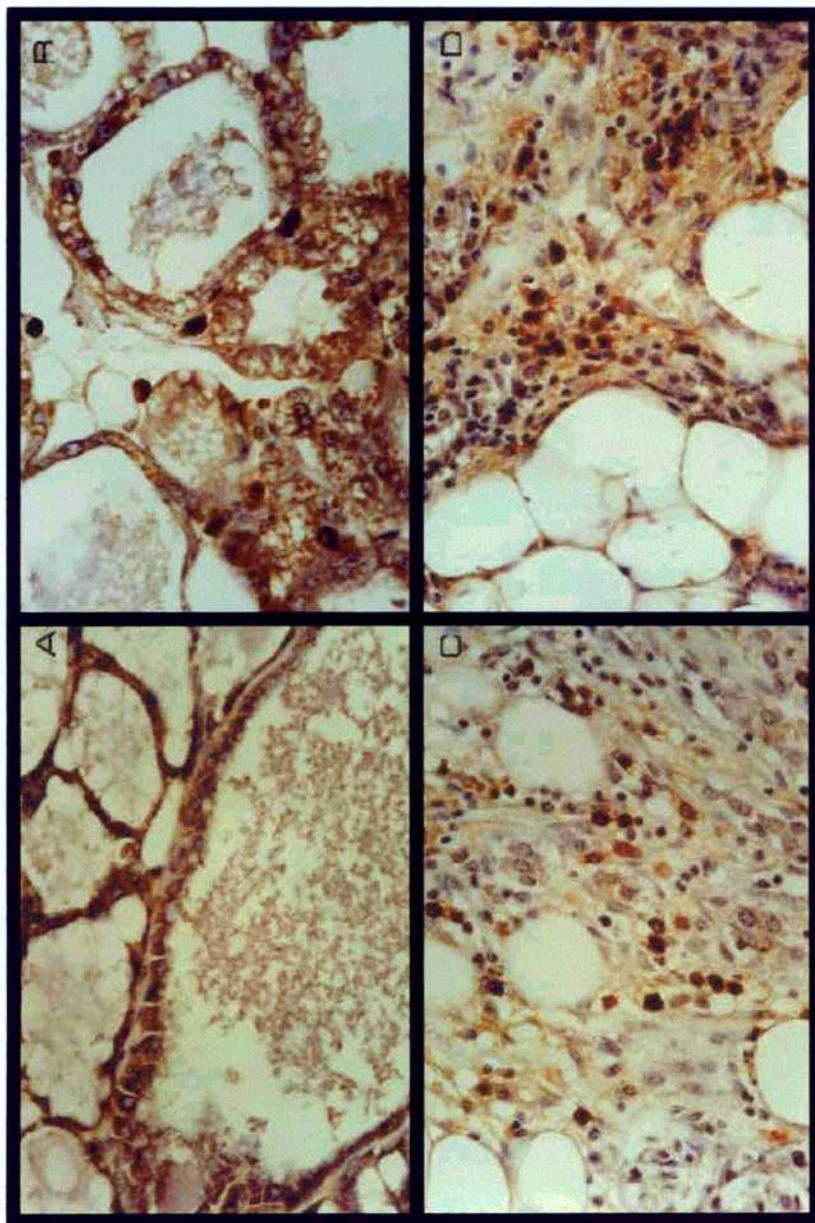


Figura 9. Estudios inmunohistoquímicos de la glándula mamaria luego del desafío con *S. aureus* 8325-4 ϕ 11. A: sección de glándula mamaria activa de un ratón control (inoculado con solución salina); B-C-D: secciones de glándula mamaria a las 24 h, 10 y 21 días post-desafío con *S. aureus*, respectivamente.

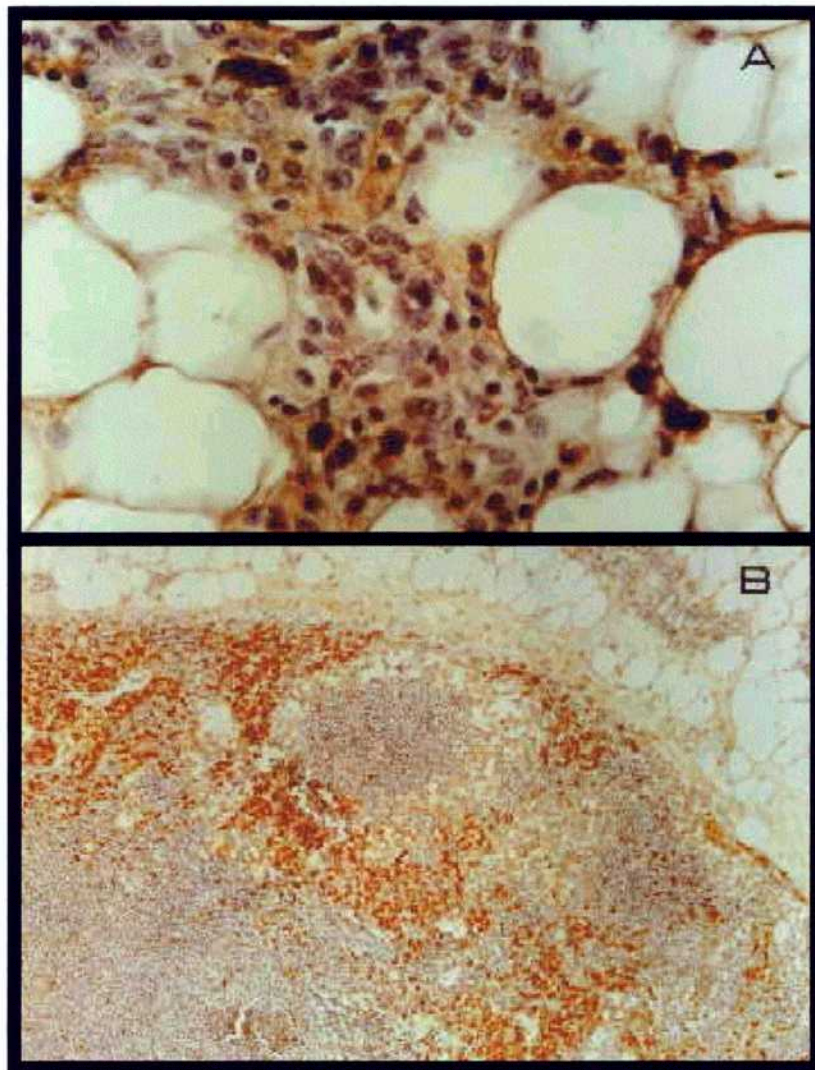


Figura 10. Estudios inmunohistoquímicos de la glándula mamaria 14 días luego del desafío con *S. aureus* 8325-4 ϕ 11.
A: alvéolo; B: nódulo linfático drenante.

3.3.3. Conclusiones parciales

En base a los estudios bacteriológicos, histológicos e inmunohistoquímicos realizados se determinó que en este modelo, la inoculación de 5×10^5 UFC de *S. aureus* 8325-4 ϕ 11 producía una mastitis aguda claramente observable a partir del día 6 post-infección. El cuadro inflamatorio aumentó en intensidad evolucionando hacia la cronicidad y alcanzando un pico en el día 14 post-infección, tiempo al cual se detectaron lesiones compatibles con enfermedad crónica en algunos ratones y de enfermedad subaguda en otros. Las lesiones histológicas observadas concordaron con las descritas durante la mastitis bovina (161). Por lo tanto, estos resultados permitieron establecer que 5×10^5 UFC era la dosis apropiada para el desarrollo de la infección *Ima* experimental por la cepa 8325-4 ϕ 11 de *S. aureus*.

3.4. INOCUIDAD DE LA CVA A523 EN LA GLANDULA MAMARIA

3.4.1. Permanencia de la CVA A523 en la glándula mamaria.

Se evaluó la atenuación de la CVA A523 en el modelo de infección *Ima* anteriormente descrito. Se desafiaron ratones hembra por la ruta *Ima* el día 14 post-parto, con 5×10^6 UFC de la CVA A523 en las mamas L4 y R4. Considerando la dosis inoculada, y a diferencia de los resultados obtenidos con la cepa virulenta parental, no se observó formación de abscesos ni zonas de necrosis tisular en las mamas de los ratones inoculados con la CVA A523. A diferentes tiempos luego de la inoculación *Ima* (4 h, 1, 3 y 7 días) se extirparon las glándulas L4 y se homogeneizaron para la realización de recuentos bacteriológicos. Nuevamente, a diferencia de los resultados obtenidos con la cepa virulenta de *S. aureus*, se observó una rápida depuración de la CVA A523 de la glándula mamaria, con una disminución significativa en el número de UFC recuperadas a los 3 días post-desafío ($p < 0.01$). Mas aún, 7 días luego de la inoculación *Ima*, la CVA A523 fue completamente erradicada de la glándula mamaria de los ratones inoculados (Fig. 11).

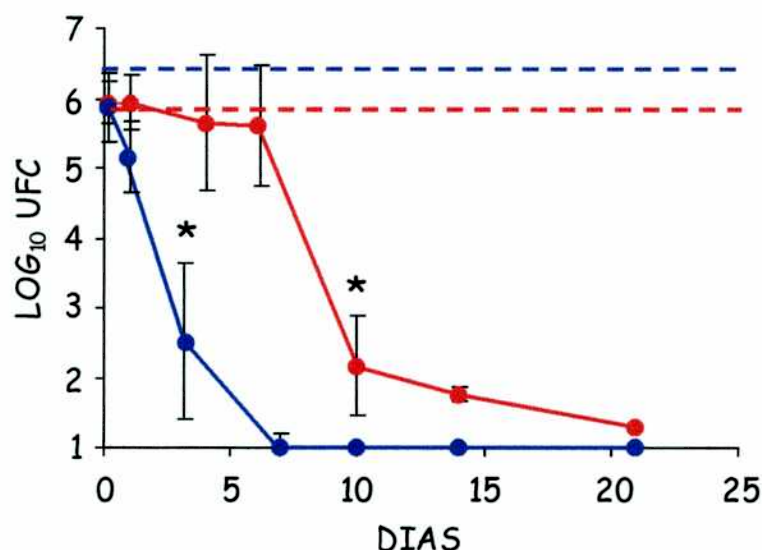


Figura 11. Permanencia de la CVA A523 en la glándula mamaria. Cada punto representa la media del $\log_{10}$ de las UFC recuperadas de 8-10 glándulas. La curva azul muestra la recuperación de la CVA A523 en comparación con la cepa parental *S. aureus* 8325-4 ϕ 11 (curva roja). Las líneas punteadas indican el inóculo administrado en cada caso. (*): $p < 0.01$, Test t de Student.

En experimentos posteriores, se evaluó la recuperación de la CVA A523 de la leche y del homogenato de la glándula mamaria luego de dos inoculaciones por la ruta local *Ima*, realizadas en distintos períodos de la preñez o la lactancia. En todos los experimentos (*exp*), el día en cual las hembras tuvieron sus crías se consideró como día cero. Los ratones se inocularon con 5×10^6 UFC en las mamas L4 y R4, los días -31 y -23 (*exp* I, inmunización antes de la preñez), -14 y -7 (*exp* II, inmunización durante la preñez), -7 y 0 (*exp* III, inmunización en la etapa tardía de la preñez) y 0 y 7 (*exp* IV, inmunización durante los primeros días de la lactancia) (Fig.12). El día 14 post-parto se evaluó la presencia de la CVA A523 en leche y homogenato de glándula mamaria. No se detectó la presencia de *S. aureus* en homogenato de la glándula mamaria de los ratones inmunizados de acuerdo a los planes I, III y IV. Por el contrario, las glándulas de todos los ratones inmunizados de acuerdo al plan II (días -14 y -7, durante la preñez) se encontraron altamente colonizadas por *S. aureus* (10^3 UFC/glándula en promedio). Cultivos duplicados a 28°C y 37°C permitieron evidenciar la presencia de bacterias revertantes al fenotipo salvaje en las glándulas colonizadas (ver discusión, página 115).

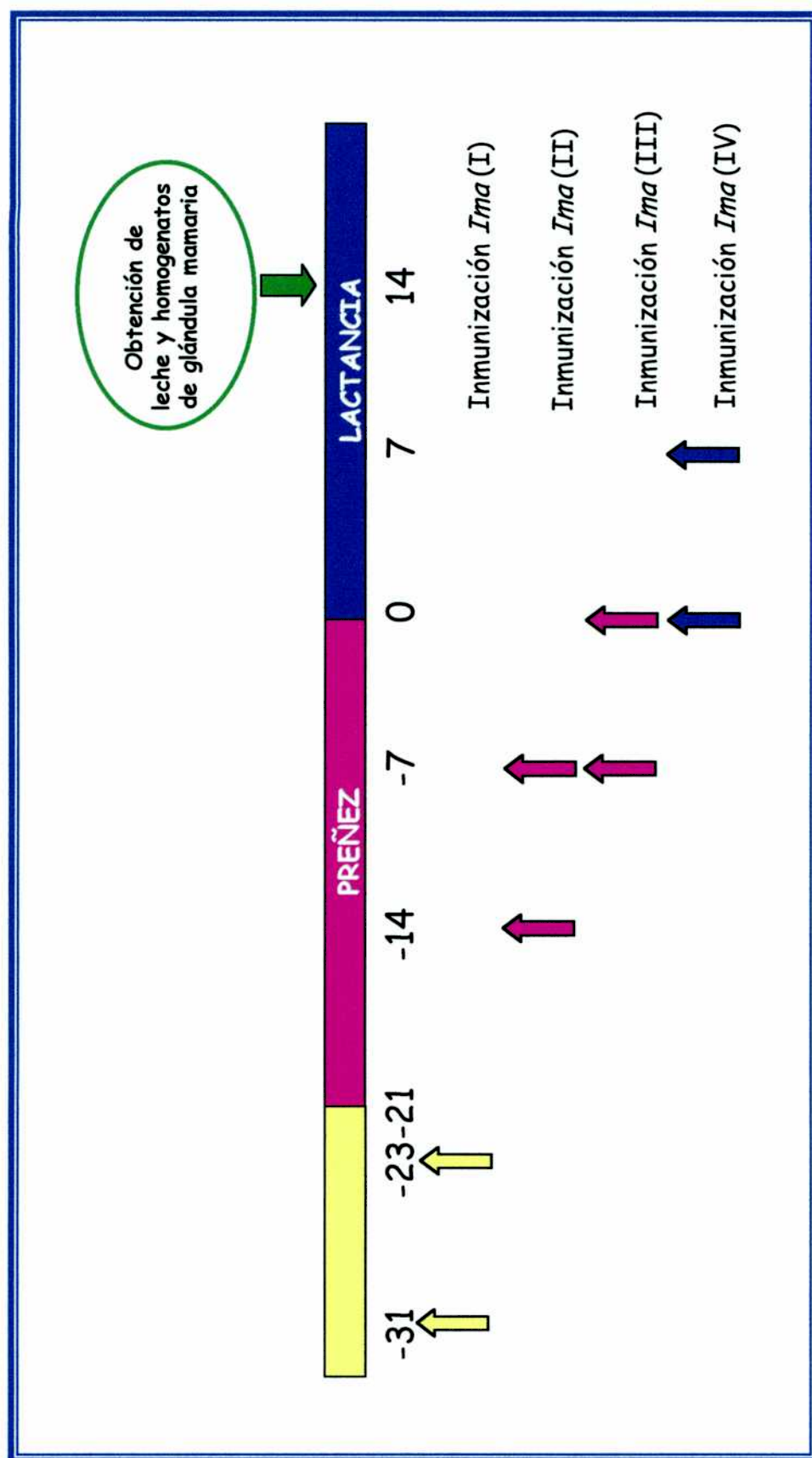


Figura 12. Esquema de los diferentes protocolos de inmunización *Ima* utilizados.

Los cultivos de leche de ratones inmunizados de acuerdo a los planes I, III y IV resultaron negativos en concordancia con los resultados obtenidos a partir de homogenatos de la glándula mamaria. Los cultivos de leche obtenida de ratones inmunizados de acuerdo al plan II resultaron 100 % positivos y en todos ellos se evidenció la presencia de bacterias revertantes al fenotipo parental.

Posteriormente, se evaluó la cinética de depuración de la CVA A523 de la glándula mamaria en ratones inmunizados de acuerdo a los planes I, III y IV (Fig. 12). Un día luego de la segunda inoculación, la totalidad de las glándulas presentó colonización con *S. aureus* A523 de aproximadamente 10^3 - 10^4 UFC/glándula independientemente del plan de inmunización utilizado (Tabla 2). La bacteria fue depurada de glándula mamaria en su totalidad 4 días luego la última inoculación en los ratones inmunizados de acuerdo al plan III y 7 días luego de la última inoculación en los ratones inmunizados de acuerdo a los planes I y IV. Mediante la realización de cultivos duplicados a 28°C y 37°C se observó que las bacterias recuperadas en todos los casos conservaron el fenotipo *ts*.

Tabla 2. Depuración de la CVA A523 de la glándula mamaria luego de dos inoculaciones *Ima*.

Días después de la segunda inoculación	Esquema de inmunización		
	I	III	IV
1	4.8×10^3	8.5×10^2	2×10^4
4	6.7×10^2	0	2×10^1
7	0	0	0
14	0	0	0

Los datos corresponden a las medianas de 10-12 glándulas.

3.4.2. Efecto de la inoculación *Ima* con la CVA A523 sobre la producción de leche y el recuento de células somáticas

A fin de evaluar la posible respuesta inflamatoria inducida en la glándula mamaria por la inmunización local, se determinó el volumen de leche producida y el

número de células somáticas en la leche de ratones control e inmunizados de acuerdo a los planes de inmunización I, III y IV. Se observó que la inmunización *Ima* no aumentó el número de células en leche ni disminuyó el volumen de leche producido. El volumen medio de leche producido fue 130 μ l/ratón (glándulas L4 y R4) y el número promedio de células somáticas fue 5×10^5 células/ml de leche. La mayoría de las células presentes en leche fueron células mononucleares, y el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares fue el mismo en la leche de los ratones inmunizados y controles.

3.4.3. Conclusiones parciales

Estos resultados demostraron que la capacidad limitada de replicación de la CVA A523 permitió que colonizara la glándula mamaria transitoriamente, luego de lo cual fue depurada. Estos resultados se obtuvieron cuando la CVA A523 se administró por la ruta *Ima* antes de la preñez, durante la etapa final de la preñez o durante la lactancia temprana. Asimismo, la CVA A523 resultó inocua al ser administrada por la ruta local dado que no indujo reacción inflamatoria (evidenciado por la ausencia de modificaciones en el SSC) y no provocó daño al epitelio secretorio (evidenciado por la falta de disminución en la producción de leche). Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación señalaron la factibilidad de utilizar la CVA A523 como inmunógeno en ensayos de protección de la glándula mamaria frente a la infección por *S. aureus* en el modelo experimental descripto.

3.5. EFECTO DE LA INMUNIZACION *Ima* CON LA CVA A523 SOBRE LA DEPURACION DE *S. aureus* 8325-4 ϕ 11 DE LA GLANDULA MAMARIA

3.5.1. Inmunización por la ruta local *Ima*

Luego de establecer el modelo de infección *Ima* por la cepa 8325-4 ϕ 11 de *S. aureus* y de demostrar la inocuidad de la CVA A523 en dicho modelo, se determinó el efecto de la inmunización local *Ima* sobre la protección de la glándula mamaria frente al desafío experimental con la cepa virulenta *S. aureus* 8325-4 ϕ 11. La protección se midió indirectamente en base a la depuración de la cepa virulenta

de la glándula mamaria en ratones inmunizados y controles. Sobre la base de los hallazgos bacteriológicos e histológicos previos (ítem 3.3), el efecto de la inmunización sobre el desarrollo de la infección *Ima* experimental fue evaluado 4 días luego del desafío. Se inmunizaron grupos de ratones hembra por la ruta local *Ima* de acuerdo a los planes de inmunización I, III y IV (Fig. 13). El plan de inmunización II no se utilizó debido a que el alto número de bacterias (de la CVA) presentes en la glándula mamaria al momento del desafío (día 14 post-parto) impediría evaluar el efecto de la inmunización sobre el desarrollo de la infección. El día 14 post-parto se realizó el desafío por la ruta *Ima* con 5×10^5 UFC de la cepa virulenta 8325-4 $\phi 11$ de *S. aureus* en las mamas L4 y R4. Cuatro días después del desafío (día 18), se analizó el número de UFC remanentes en la glándula mamaria de ratones control (no vacunados) e inmunizados (Fig. 13).

La inmunización local por medio de los planes III y IV indujo un aumento significativo ($p < 0.02$) en la depuración de la cepa salvaje de *S. aureus* de la glándula mamaria (Fig. 14). Por el contrario, cuando los ratones se inmunizaron antes de la preñez (*exp I*), no se hallaron diferencias significativas en el número de UFC recuperadas de la glándula mamaria con respecto a los ratones control ($p > 0.5$).

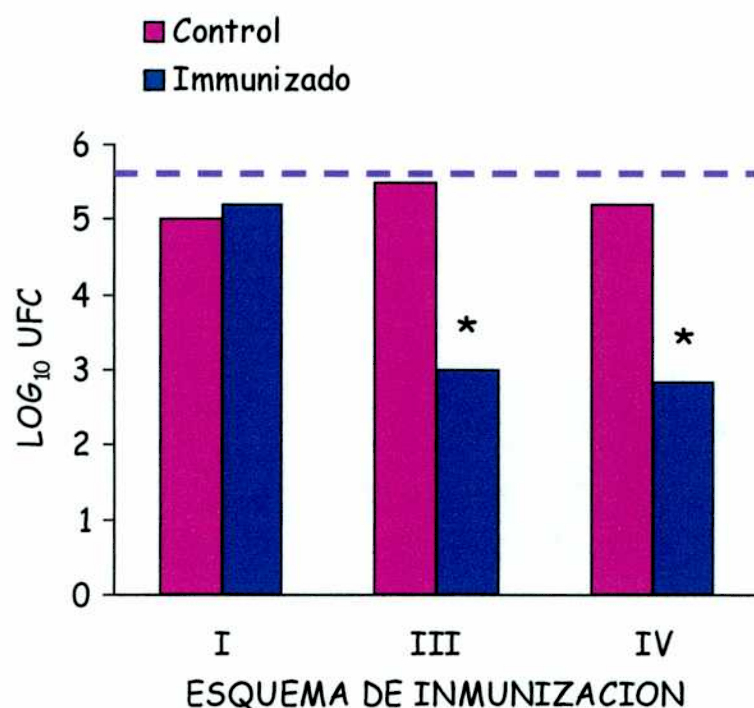


Figura 14. Efecto de la inmunización local con la CVA A523 sobre la depuración de *S. aureus* de la glándula mamaria. Cada barra representa la mediana del $\log_{10}$ de las UFC recuperadas en cada grupo (n: 20). La línea punteada indica el inóculo promedio de *S. aureus* 8325-4 $\phi 11$ administrado. (*): $p < 0.02$, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney.

3.5.2. Inmunización por la ruta sistémica *ip*

A fin de evaluar la importancia de la ruta de administración del inmunógeno en la protección de la glándula mamaria, en otra serie de experimentos se determinó el efecto de la inmunización por la ruta sistémica *ip* en la depuración de *S. aureus* de la glándula mamaria luego del desafío experimental por la ruta *Ima*. Se inmunizaron grupos de ratones por la ruta sistémica mediante 2 inoculaciones *ip* que contenían 5×10^6 UFC de la CVA A523 los días 0 y 7 (*exp V*, Fig. 13) o 3 inoculaciones que

contenían 10^8 UFC de la CVA A523 los días -7, 0 y 7 (exp VI, Fig. 13). El día 14 post-parto se realizó el desafío por la ruta *Ima* con 5×10^5 UFC de la cepa virulenta 8325-4 $\phi 11$ de *S. aureus* en las mamas L4 y R4. Cuatro días más tarde, se analizó el número de UFC remanentes en la glándula mamaria de ratones control e inmunizados. Contrariamente a los resultados obtenidos luego de la inmunización local *Ima*, el número de UFC recuperado de la glándula mamaria de ratones inmunizados por la ruta *ip* con la CVA A523 no difirió significativamente ($p > 0.5$) del recuperado de la glándula mamaria de ratones control independientemente del plan de vacunación utilizado (exp V o exp VI) (Fig. 15).

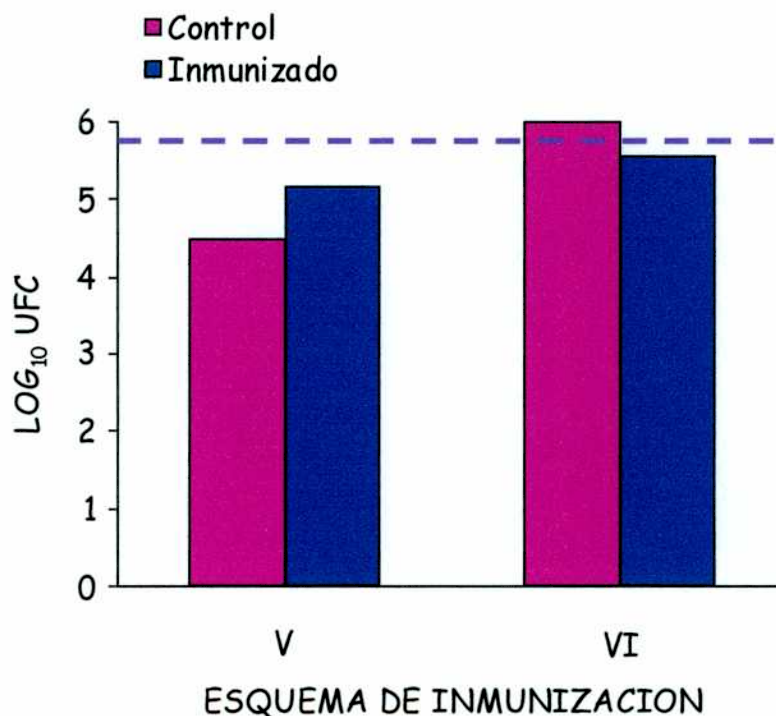


Figura 15. Efecto de la inmunización *ip* con la CVA A523 sobre la depuración de *S. aureus* de la glándula mamaria. Cada barra representa la mediana del $\log_{10}$ de las UFC recuperadas en cada grupo (n: 20). La línea punteada indica el inóculo promedio de *S. aureus* 8325-4 $\phi 11$ administrado.

3.5.3. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos indicaron que la inmunización local *Ima* con la CVA A523 durante la lactancia o durante la etapa final de la preñez indujo protección en la glándula mamaria frente a la infección experimental por la cepa virulenta parental. Esto se evidenció por un aumento significativo en la depuración de la cepa *S. aureus*

8325-4 ϕ 11 de la glándula mamaria de ratones inmunizados, que no se observó en los ratones control. La inmunización por la ruta *ip*, por el contrario, no confirió protección alguna en la glándula mamaria frente a la infección experimental estafilocócica.

3.6. EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON LA CVA A523 EN LA INDUCCION DE INMUNIDAD HUMORAL

3.6.1. Anticuerpos específicos en leche

Se evaluó la respuesta inmune humoral inducida en la glándula mamaria luego de inmunización con la CVA A523 a fin de determinar su rol en la protección obtenida luego de la vacunación. Para ello, se inmunizaron grupos de ratones hembra por la ruta *Ima* de acuerdo a los diferentes planes de inmunización descriptos anteriormente (Fig. 13). Se observó un aumento significativo en los niveles de IgA en leche anti-*S. aureus* (bacteria completa muerta por calor) en ratones inmunizados por la ruta *Ima* independientemente del plan de vacunación utilizado (Fig. 16 A) ($p < 0.05$, exp I; $p < 0.01$, exp III y IV). Los valores de IgA anti-*S. aureus* determinados en leche de ratones inmunizados durante los primeros días de la lactancia, fueron aún significativamente mayores a los medidos en los ratones inmunizados de acuerdo a los otros esquemas (Fig. 16 A, exp IV, $p < 0.05$, comparado con exp I y III). Asimismo, se observó un aumento significativo de los niveles de IgG anti-*S. aureus* en la leche de los ratones inmunizados por la ruta *Ima*, con respecto a los ratones control, independientemente del plan de inmunización utilizado (Fig. 16 B, $p < 0.05$, exp I; $p < 0.01$, exp III y IV). Sin embargo, los valores de IgG hallados en la leche de los ratones inmunizados durante el final de la preñez, resultaron significativamente mayores a los detectados en ratones inmunizados mediante los otros esquemas (Fig. 16 B, exp III, $p < 0.05$, comparado con exp I y IV). En otra serie de experimentos se evaluó la respuesta inmune humoral inducida mediante la inmunización por la ruta sistémica *ip* (Fig. 13). A diferencia de los resultados observados en los ratones inmunizados por la ruta local *Ima*, no se detectó un aumento significativo en los niveles de IgA anti-*S. aureus* en la leche

de los ratones inmunizados por la ruta *ip* (Fig. 16 C, exp V y VI). Cuando se evaluaron los niveles de IgG específica en la leche, se detectó un aumento significativo ($p < 0.05$) sólo cuando los ratones recibieron 3 inoculaciones que contenían 10^8 UFC de la CVA A523 (Fig. 16 C, exp VI).

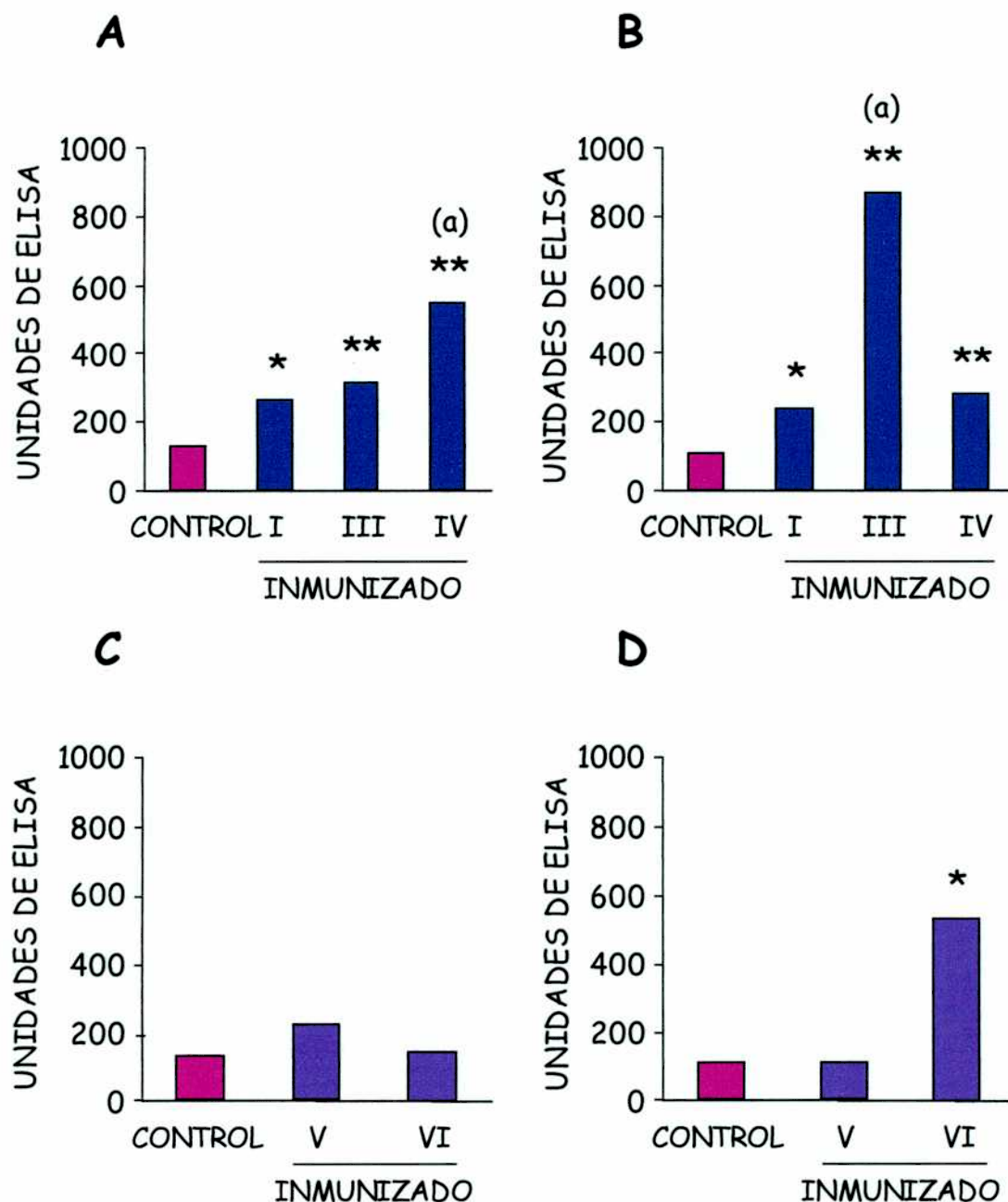


Figura 16. Efecto de la inmunización con la CVA A523 sobre los niveles de anticuerpos anti-*S. aureus* en leche. A, B: IgA e IgG, respectivamente, en la leche de los ratones inmunizados por la ruta *Ima*; C, D: IgA e IgG, respectivamente, en la leche de ratones inmunizados por la ruta *ip*. Cada barra representa la mediana de las Unidades de ELISA determinadas para cada grupo (n: 10). (*): $p < 0.05$, (**): $p < 0.01$, (a): $p < 0.05$, comparado con los exp I y III (A) o con los exp I y IV (B), Test de Mann-Whitney. Unidades de ELISA: $A_{405} \times \text{dil}^{-1} \times 100$.

3.6.2. Anticuerpos específicos en plasma

Al evaluar los niveles de anticuerpos en plasma se observó un aumento significativo de IgG anti-*S. aureus* (evaluados contra bacteria completa muerta por calor) en los ratones inmunizados por la ruta local *Ima*, durante la etapa final de la preñez o la lactancia (Fig. 17 A, exp III y IV) con respecto a los ratones control ($p < 0.01$). En los ratones inmunizados por la ruta *ip* se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de IgG anti-*S. aureus* en el plasma, independientemente del plan de inmunización (V o VI) utilizado (Fig. 17 B). Los niveles de anticuerpos en los ratones que recibieron 3 inoculaciones que contenían 10^8 UFC (exp VI) fueron aún significativamente mayores a los medidos en los ratones que recibieron 2 inoculaciones con 5×10^6 UFC ($p < 0.05$).

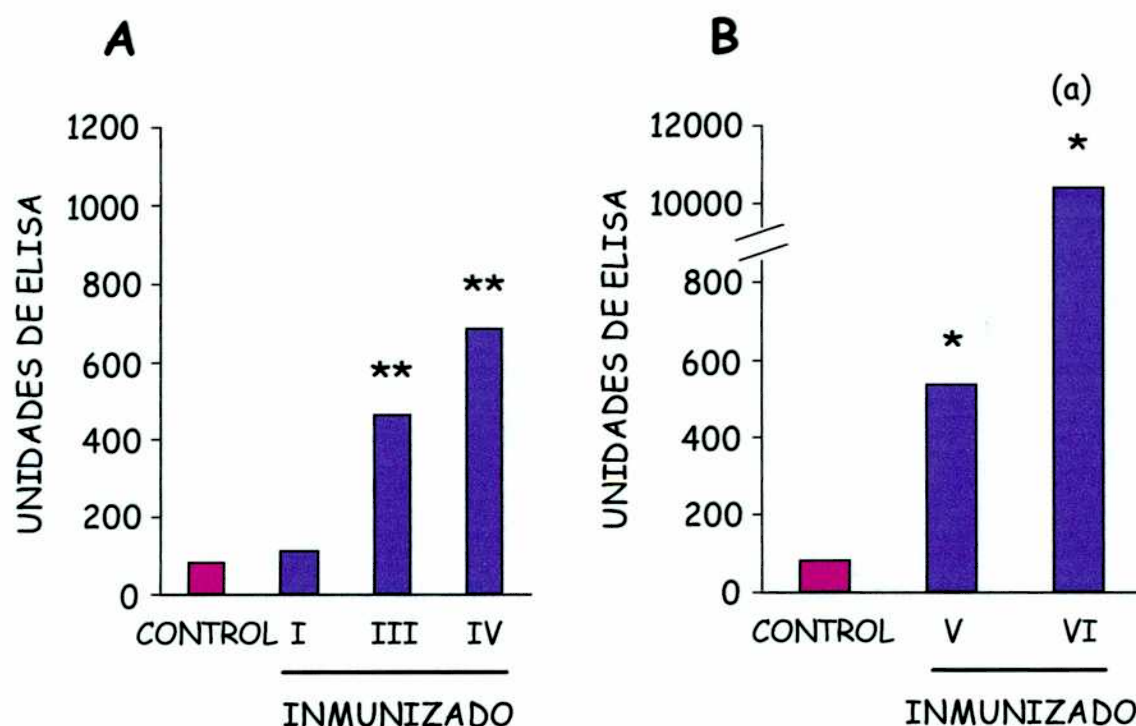


Figura 17. Efecto de la inmunización con la CVA A523 sobre los niveles de anticuerpos anti-*S. aureus* en plasma. A: IgG en el plasma de ratones inmunizados por la ruta *Ima*; B: IgG en el plasma de ratones inmunizados por la ruta *ip*. Cada barra representa la mediana de las unidades de ELISA determinadas para cada grupo (n: 10). (*): $p < 0.05$, (**): $p < 0.01$, (a): $p < 0.05$, comparado con el plan de inmunización V, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney. Unidades de ELISA: $A_{405} \times \text{dil}^{-1} \times 100$.

3.6.3. Caracterización de los anticuerpos inducidos por la inmunización *Ima*

Posteriormente, se caracterizaron algunos de los exoproductos y antígenos estructurales de *S. aureus* involucrados en la respuesta inmune inducida en la glándula mamaria por inmunización local con la CVA A523. Entre los diferentes exoproductos secretados por *S. aureus*, se determinaron los niveles de anticuerpos anti-hemolisina α . La inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo un aumento significativo en los niveles de IgA (*exp* IV) e IgG (*exp* I y III) en leche así como en los niveles de IgG (*exp* I, III y IV) en plasma anti-hemolisina α (Tabla 3, $p < 0.001$). Se analizaron además los niveles de anticuerpos anti-ácidos lipoteicoicos (constituyente principal de la pared de *S. aureus*) y anti-proteínas totales de *S. aureus* en leche y plasma de los ratones inmunizados con la CVA A523. Al analizar los niveles de IgA anti-ácidos lipoteicoicos en leche, sólo se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los controles en los ratones inmunizados durante el final de la preñez (*exp* III) (Tabla 3). Por el contrario, se observó un aumento significativo en los niveles de IgG anti-ácidos lipoteicoicos en la leche de los ratones inmunizados de acuerdo a los esquemas I y III (Tabla 3, $p < 0.001$). Al analizar la presencia de anticuerpos anti-proteínas totales de *S. aureus*, se observó un aumento significativo en los niveles de IgA (*exp* III y VI, $p < 0.001$, $p < 0.01$, respectivamente) e IgG (*exp* I y III, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectivamente) en la leche de ratones inmunizados con respecto a los ratones control. Los niveles de IgG en plasma anti-ácidos lipoteicoicos y anti-proteínas totales de *S. aureus* resultaron significativamente mayores en los ratones inmunizados con respecto a los controles, independientemente del plan de inmunización local utilizado (Tabla 3, $p < 0.001$).

Tabla 3. Efecto de los diferentes esquemas de inmunización local en los niveles de anticuerpos en leche y plasma específicos contra antígenos de *S. aureus*.

Inmunoglobulina	Antígeno	Unidades de ELISA			
		Control	I	III	IV
IgA en Leche	Hemolisina α	27	19	92	659 ^c
	Acidos lipoteicoicos	70	3	140 ^a	147
	Proteínas totales	85	44	239 ^c	183 ^b
IgG en Leche	Hemolisina α	21	1284 ^c	994 ^c	38
	Acidos lipoteicoicos	0	1695 ^c	487 ^c	26
	Proteínas totales	61	381 ^b	606 ^c	73
IgG en Plasma	Hemolisina α	34	1540 ^c	931 ^c	400 ^c
	Acidos lipoteicoicos	4	605 ^c	501 ^c	1108 ^c
	Proteínas totales	99	333 ^c	272 ^c	1018 ^c

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, niveles de significación comparado con el grupo control. Cada valor representa la mediana de las unidades de ELISA determinadas para cada grupo (n: 10). Unidades de ELISA: $A_{405} \times \text{dil}^{-1} \times 100$.

3.6.4. Conclusiones parciales

Estos resultados indicaron que el aumento de la depuración de *S. aureus* de la glándula mamaria inducido mediante la inmunización local con la CVA A523 se correlacionó con un incremento en los niveles de IgA e IgG anti-*S. aureus* en la leche. La presencia de anticuerpos de tipo IgG en plasma y leche de los ratones inmunizados por la ruta *ip* no otorgó protección de la glándula mamaria frente a la infección experimental por *S. aureus*. La inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo la producción de anticuerpos anti-hemolisina α . Este hallazgo demostró, indirectamente, la producción *in vivo* de hemolisina α por parte de la CVA A523 durante su permanencia transitoria en la glándula mamaria.

La inmunización *Ima* con la CVA A523 en la etapa final de la preñez o durante la primer semana de la lactancia resultó igualmente eficaz para inducir una respuesta inmune humoral en la glándula mamaria y otorgar protección frente al desafío con la cepa virulenta parental. Por lo tanto, considerando que la inmunización durante la etapa final de la preñez sería el esquema más factible para su posterior utilización en rumiantes, la siguiente etapa de la investigación se realizó utilizando este esquema de inmunización.

3.7. EFECTO DE LA INMUNIZACION LOCAL CON LA CVA A523 SOBRE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS PRESENTES EN GANGLIOS LINFATICOS DRENANTES DE LA GLANDULA MAMARIA

Con el propósito de caracterizar las poblaciones linfocitarias involucradas en la respuesta inmune anti-*S. aureus* inducida por la inmunización *Ima*, se determinó el porcentaje relativo de las diferentes subpoblaciones de linfocitos presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria, provenientes de ratones control e inmunizados, mediante marcación de antígenos de superficie y posterior detección por citometría de flujo. En una serie de experimentos preliminares, se obtuvieron células de los ganglios drenantes de la glándula mamaria de ratones control y se procedió a la marcación de antígenos de superficie. La marcación se realizó sin bloqueo previo de sitios inespecíficos (Fig. 18, paneles izquierdos) o con bloqueo de sitios inespecíficos mediante la incubación con suero normal de ratón (30 min a 37°C) previo a la adición de los anticuerpos específicos (Fig. 18, paneles derechos). El bloqueo previo permitió disminuir la unión inespecífica del anticuerpo y distinguir con mayor claridad las poblaciones negativa y positiva para los marcadores analizados (Fig. 18A,B; CD3 y CD8, respectivamente). Se obtuvieron resultados similares para otros marcadores (resultados no mostrados).

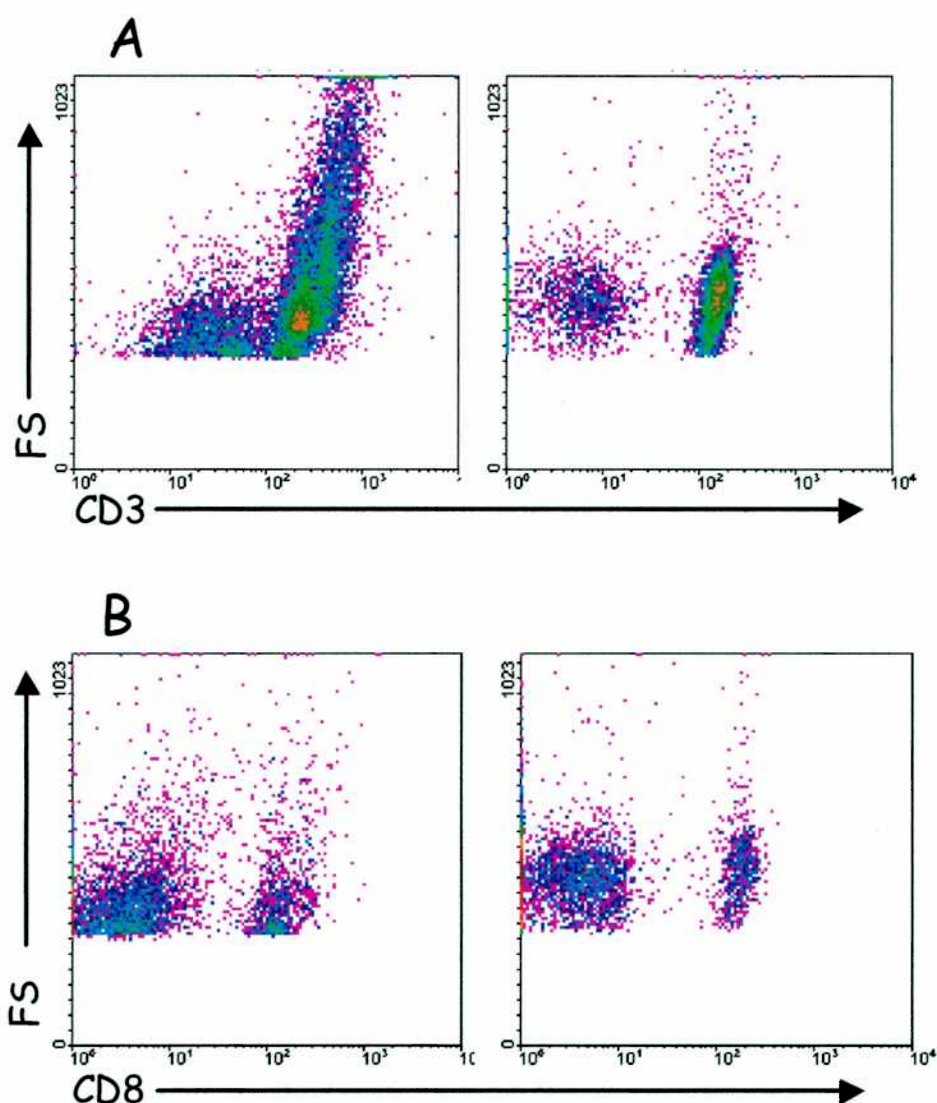


Figura 18. Detección de antígenos de superficie por citometría de flujo. La población de linfocitos fue seleccionada en base a su FSC/SSC y posteriormente analizada para cada uno de los marcadores indicados.

Luego de establecer las condiciones óptimas para la detección de antígenos de superficie, se procedió a caracterizar las poblaciones de linfocitos presentes en ganglios linfáticos regionales de la glándula mamaria luego de la inmunización local con la CVA A523. Para ello, se inocularon grupos de ratones hembra con 5×10^6 UFC de la CVA A523 por la ruta *Ima* durante la última semana de la preñez (días -7 y 0, exp III, Fig. 13, Fig 19). Los ratones pertenecientes al grupo control se inocularon con solución salina. Diez días luego de la segunda inoculación se obtuvieron células mononucleares de los ganglios drenantes de las glándula L4 y R4 de ratones inmunizados y controles (Fig. 19) y se procedió a la marcación de antígenos linfocitarios de superficie.

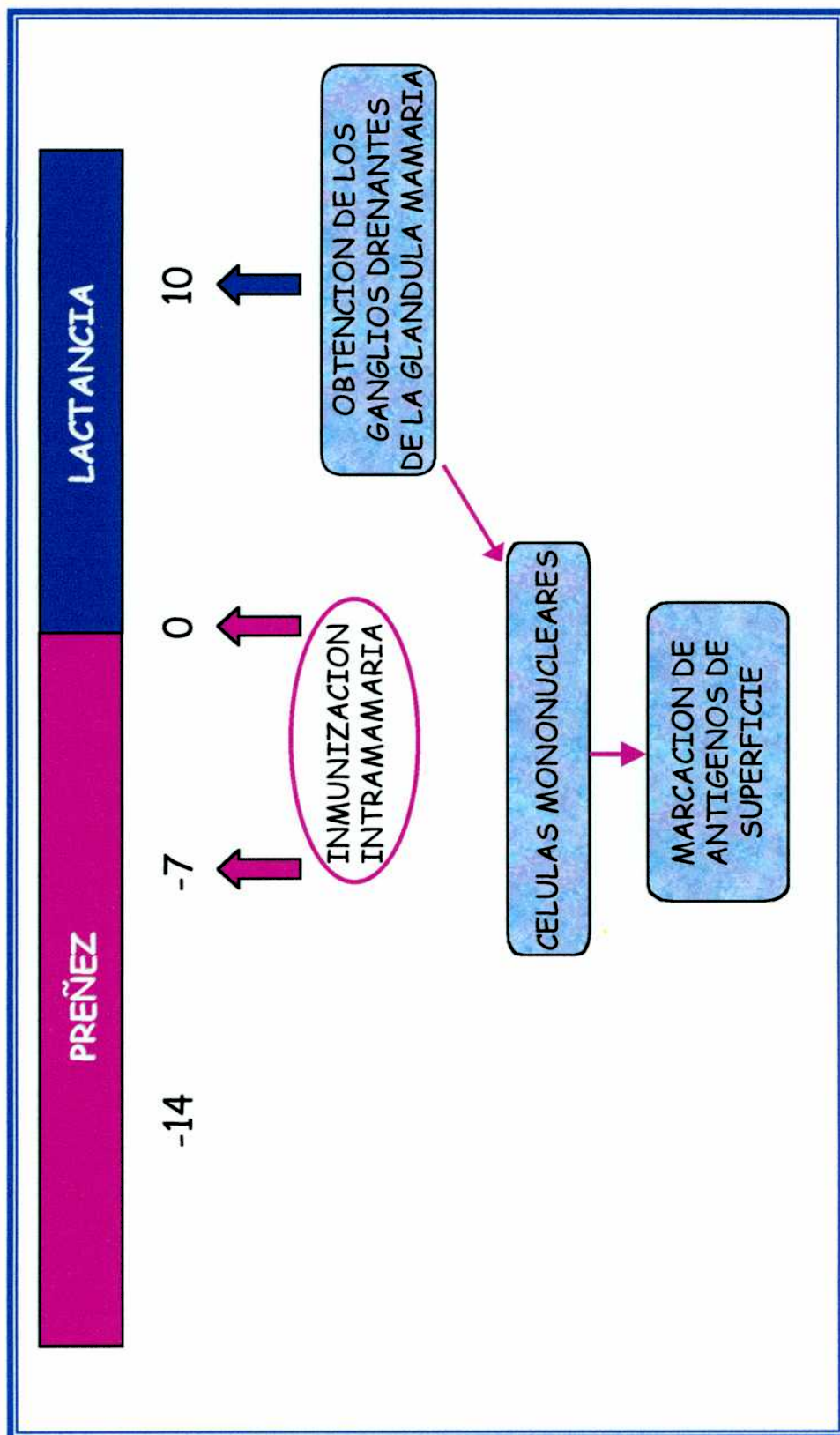


Figura 19. Caracterización de las subpoblaciones linfocitarias de los nódulos linfáticos drenantes de la glándula mamaria

La Fig. 20 muestra las subpoblaciones de linfocitos presentes en los ganglios drenantes de la glándula mamaria de los ratones control e inmunizados. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje relativo de linfocitos T (LT) CD3+ en los ganglios de ratones inmunizados, en comparación con el porcentaje obtenido en ganglios de ratones control. Simultáneamente, se observó que la inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos B (LB) en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria ($p < 0.01$). La relación LTCD4:LTCD8 no difirió significativamente entre ratones control e inmunizados (Control: 6.1 [rango: 5.3-7.4], Inmunizados: 7.3 [rango:5.8-8.4]). Al día 10 luego de la segunda inoculación, no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes relativos de LT con receptor $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados. Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones en los porcentajes de células NK (CD3+ y CD3-) presentes en los ganglios linfáticos regionales de la glándula mamaria.

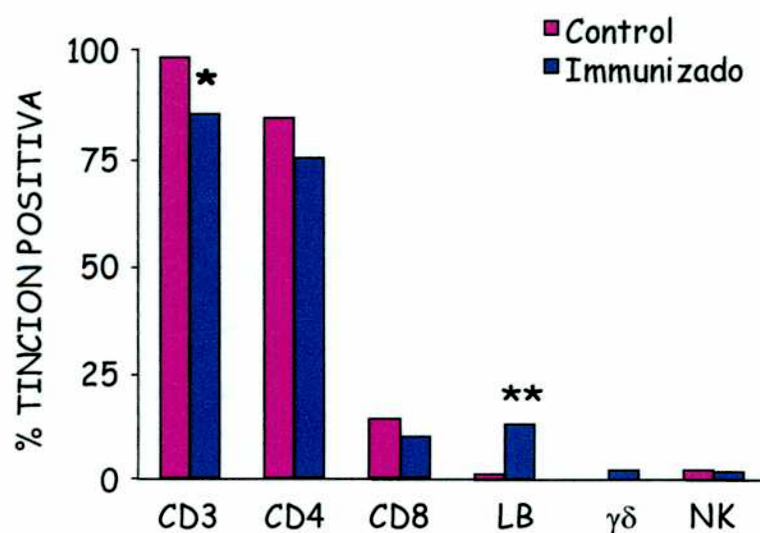


Figura 20. Efecto de la inmunización *Ima* sobre las subpoblaciones linfocitarias presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria. Los resultados se expresan como la mediana del porcentaje de células con tinción positiva para cada marcador. $\gamma\delta$: LT $\gamma\delta$, NK: células NK. Cada barra representa la mediana de 8-10 ratones (*): $p < 0.05$, (**): $p < 0.01$, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney.

Luego se evaluó el grado de activación de los LT y LB inducido por la inmunización local con la CVA A523. Para ello se realizaron tinciones dobles para LT CD3+ o LB y para el receptor de IL-2 (CD25) en células provenientes de ratones inmunizados y control. Se observó expresión del receptor de IL-2 en el 10% de los LT CD3+ (8.5 % de los linfocitos totales) (Fig. 21 A). Por el contrario, no se detectaron LT activados en los ganglios provenientes de ratones control. Al analizar la activación de los LB, se observó expresión del receptor de IL-2 en el 100% de los LB provenientes de ratones inmunizados (15 % de los linfocitos totales) (Fig. 21 B). Por el contrario, no se observaron LB activados en las células provenientes de los ratones control.

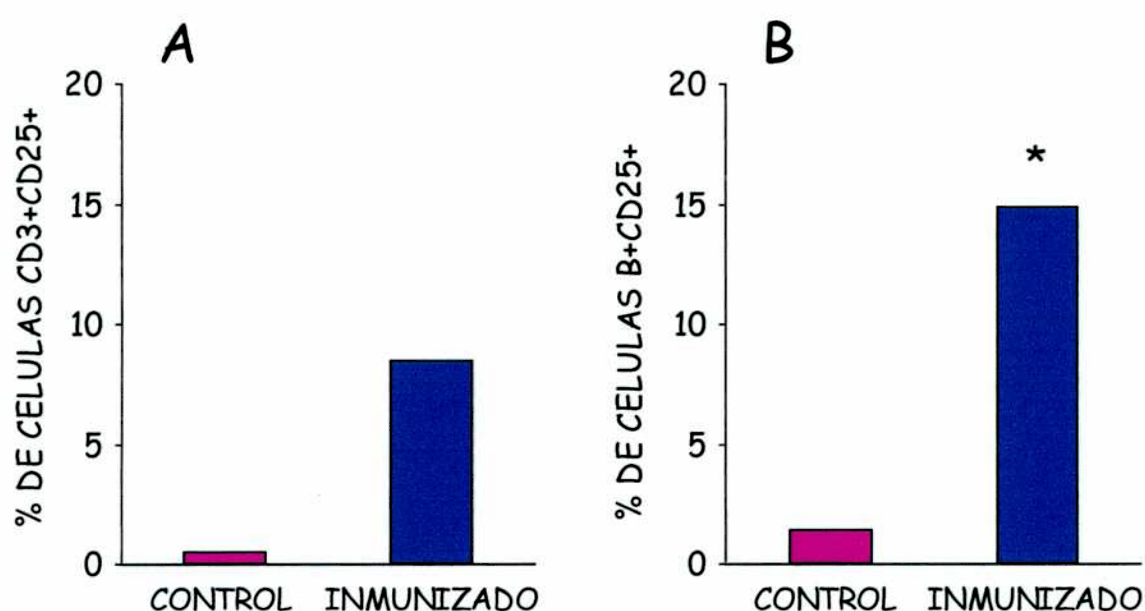


Figura 21. Efecto de la inmunización *Ima* con la CVA A523 sobre la activación de linfocitos. A: Expresión de CD25 en LT CD3+; B: Expresión de CD25 en LB. Los resultados se expresan como la mediana del porcentaje de células con tinción positiva con respecto al total de linfocitos presentes en los ganglios. Cada barra representa la mediana de 8-10 ratones. (*): $p < 0.01$, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney.

A modo de ejemplo, en la Fig. 22 B se muestra la marcación doble para LB y CD25 en células provenientes de ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de un ratón inmunizado por la ruta *Ima* con la CVA A523. En la Fig. 22A se muestra la marcación con anticuerpos dirigidos hacia antígenos irrelevantes.

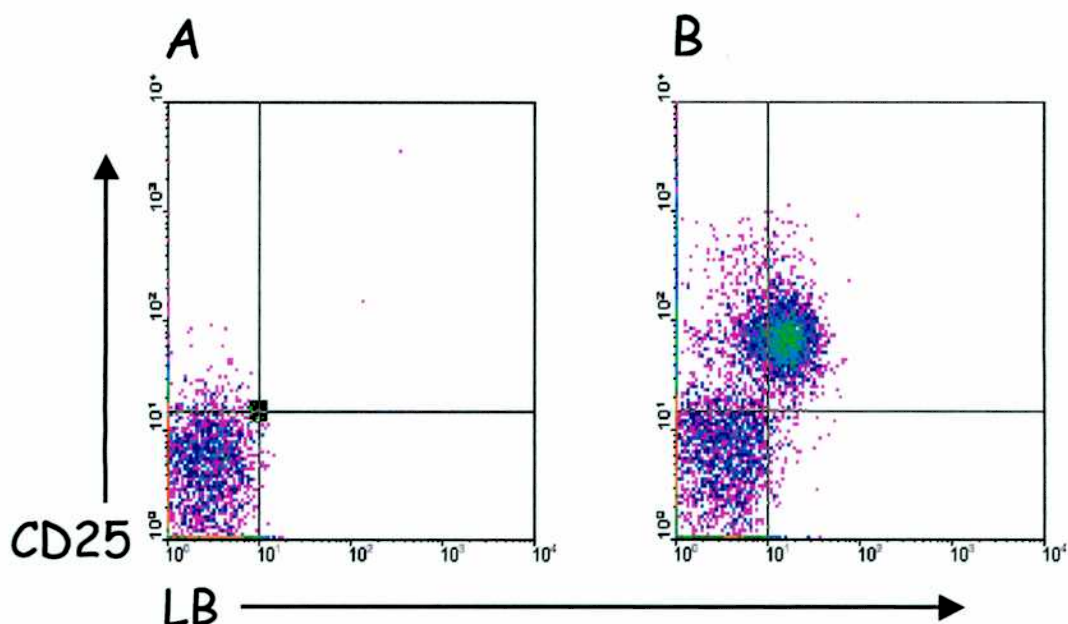


Figura 22. Expresión del receptor de IL-2 en LB de ratones inmunizados por la ruta *Ima*. A: células provenientes de un ratón inmunizado marcadas con anticuerpos irrelevantes; B: células provenientes de un ratón inmunizado marcadas con anticuerpos específicos. CD25: receptor de IL-2.

3.7.1. Conclusiones parciales

La inmunización por la ruta *Ima* con la CVA A523 indujo un aumento en el porcentaje relativo de LB en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria con la consiguiente disminución en el porcentaje relativo de LT CD3+. No se observaron cambios en los porcentajes relativos de otras poblaciones leucocitarias. La inmunización *Ima* indujo además activación de LB y LT.

3.8. EFECTO DE LA INMUNIZACION *Ima* CON LA CVA A523 EN LA INDUCCION DE INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS EN LA GLANDULA MAMARIA

3.8.1. Respuesta proliferativa *in vitro* contra *S. aureus*

A fin de evaluar la capacidad de la inmunización *Ima* con la CVA A523 de inducir inmunidad mediada por células en la glándula mamaria, se determinó la respuesta proliferativa *in vitro* luego de la estimulación con *S. aureus*.

Se inocularon grupos de ratones hembra con 5×10^6 UFC de la CVA A523 por la ruta *Ima* durante la última semana de la preñez (días -7 y 0, *exp III*, Fig. 13, Fig. 23). Los ratones pertenecientes al grupo control se inocularon con solución salina. Diez días luego de la segunda inoculación se obtuvieron células mononucleares de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones inmunizados y controles. Las células se cultivaron en presencia de medio solo o de medio que contenía diferentes densidades de *S. aureus* (10^7 , 10^8 UFC/ml, bacteria completa muerta por calor) (Fig. 23). Luego de 96 h de cultivo se evaluó la proliferación celular mediante la detección de la incorporación de ^3H -Timidina.

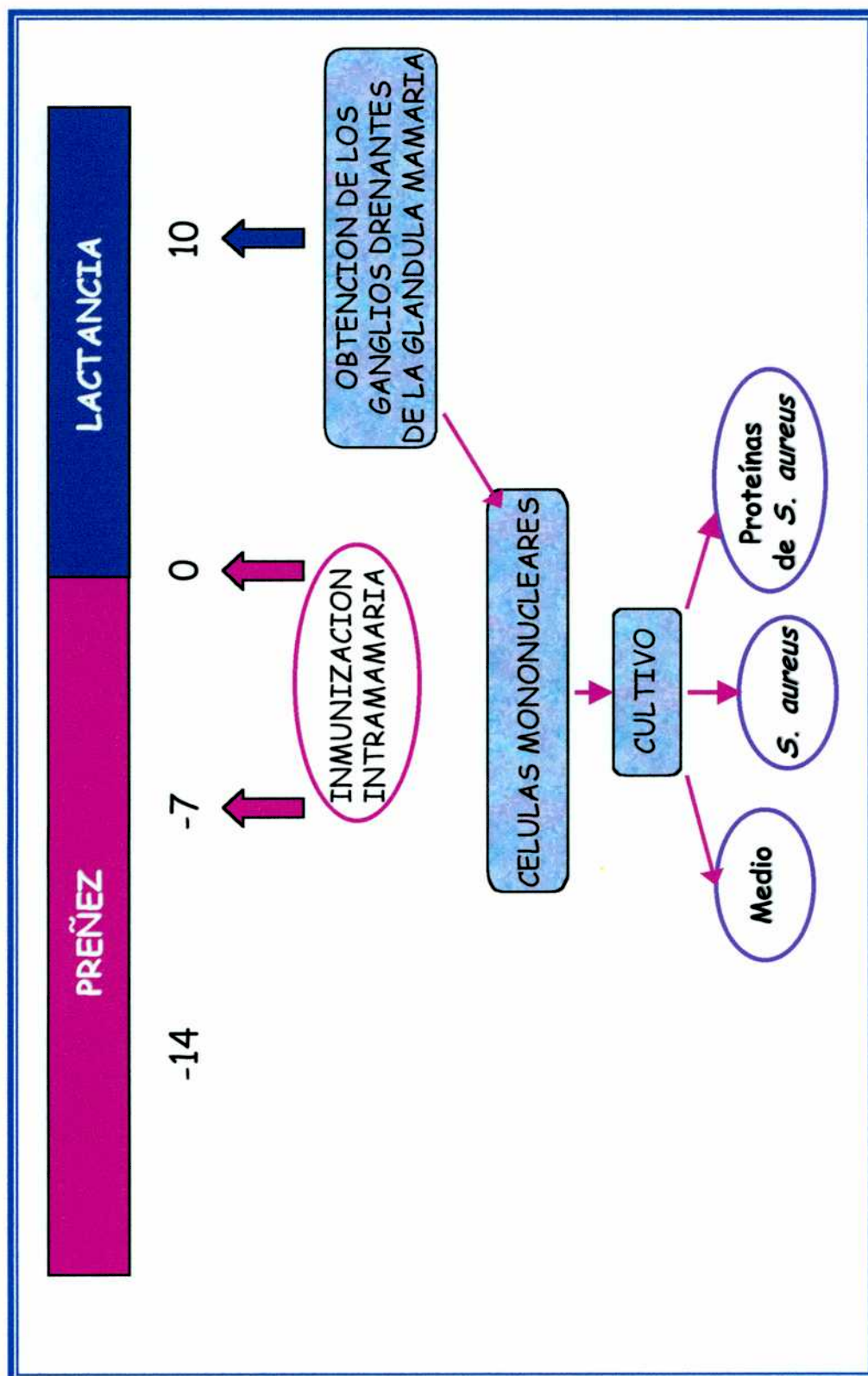


Figura 23. Respuesta proliferativa *in vitro* contra *S. aureus*

Se observó una fuerte respuesta proliferativa por parte de los linfocitos provenientes de ratones inmunizados, al ser cultivados en presencia de 10^8 UFC/ml de *S. aureus* (Fig. 24 B, $p < 0.05$). Por el contrario, las células provenientes de ratones control no mostraron respuestas proliferativas frente al estímulo *in vitro* con *S. aureus* (Fig. 24 A).

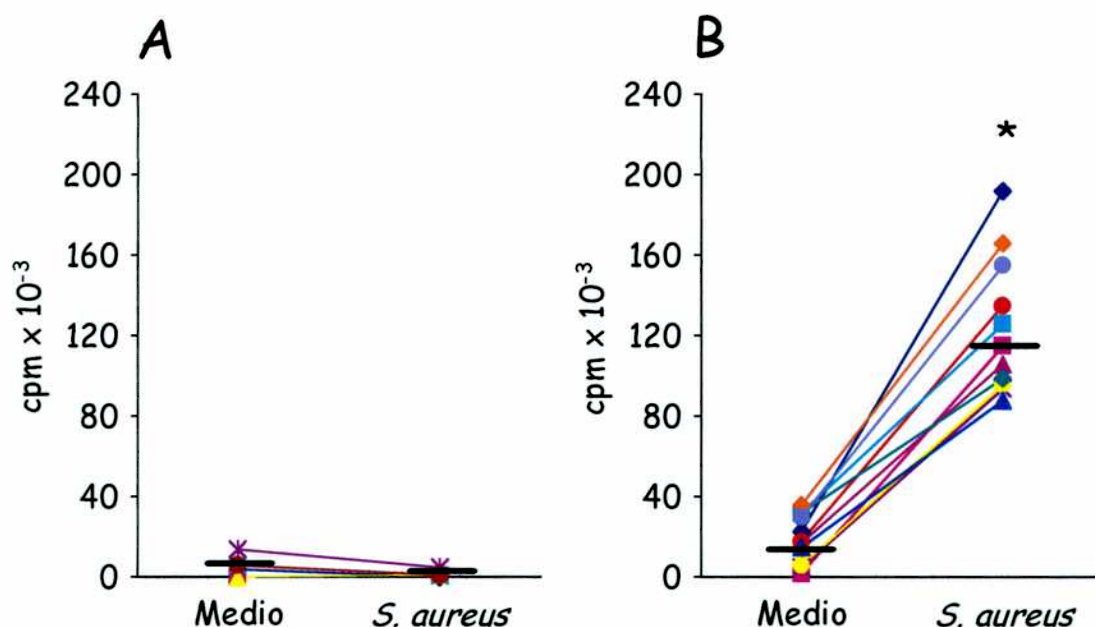


Figura 24. Proliferación celular *in vitro* frente a *S. aureus*. A: células provenientes de ratones control; B: células provenientes de ratones inmunizados. Cada línea conecta el valor de las cpm medidas en presencia de *S. aureus* o medio solo, a nivel de ratones individuales. Las líneas negras horizontales indican la mediana del valor de las cpm obtenidas en cada grupo. El nivel de significación se determinó mediante el Test de Wilcoxon para muestras pareadas, comparando la mediana de las cpm medidas luego de la estimulación con *S. aureus* vs. la mediana de las cpm medidas en medio solo, (*): $p < 0.001$. La figura muestra los resultados de un experimento representativo de 3 realizados.

En la preparación de *S. aureus* muerto por calor utilizada como estímulo en los ensayos de proliferación, los antígenos proteicos podrían no encontrarse conservados. Por este motivo, en experimentos subsecuentes se evaluó la respuesta proliferativa de las células provenientes de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados frente a extractos proteicos de *S. aureus* (Fig. 23). Al igual que durante la estimulación con la bacteria completa, las células provenientes de los ganglios de los ratones inmunizados mostraron una respuesta proliferativa significativamente mayor

($p < 0.05$) en presencia de proteínas de *S. aureus* (Fig. 25 B) con respecto a medio solo, que no se observó en las células provenientes de ratones control (Fig. 25 A).

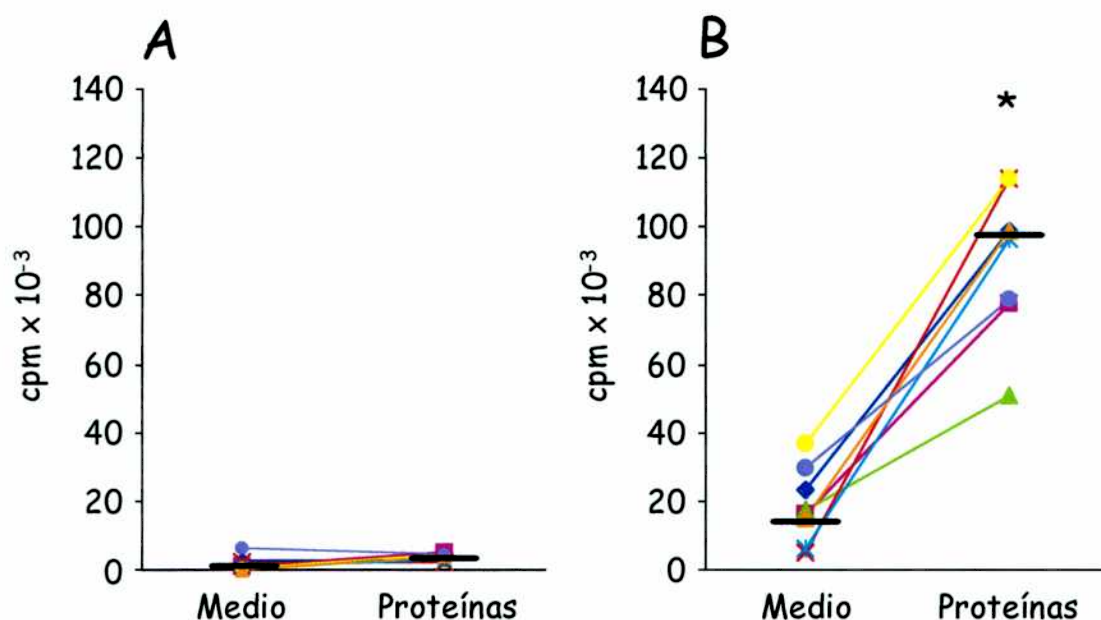


Figura 25. Proliferación celular *in vitro* frente a proteínas de *S. aureus*. A: células provenientes de ratones control; B: células provenientes de ratones inmunizados. Cada línea conecta el valor de las cpm medidas en presencia de proteínas de *S. aureus* (10 µg/ml) o medio solo a nivel de ratones individuales. Las líneas negras horizontales indican la mediana del valor de las cpm obtenidas en cada grupo. El nivel de significación se determinó mediante el Test de Wilcoxon para muestras pareadas, comparando la mediana de las cpm medidas luego de la estimulación con proteínas de *S. aureus* vs. la mediana de las cpm medidas en medio solo, (*): $p < 0.01$. La figura muestra los resultados de un experimento representativo de 3 realizados.

En base a la totalidad de los experimentos realizados, se determinó el índice estimulador obtenido para las respuestas secundarias *in vitro* de células de ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones inmunizados y control (Fig. 26).

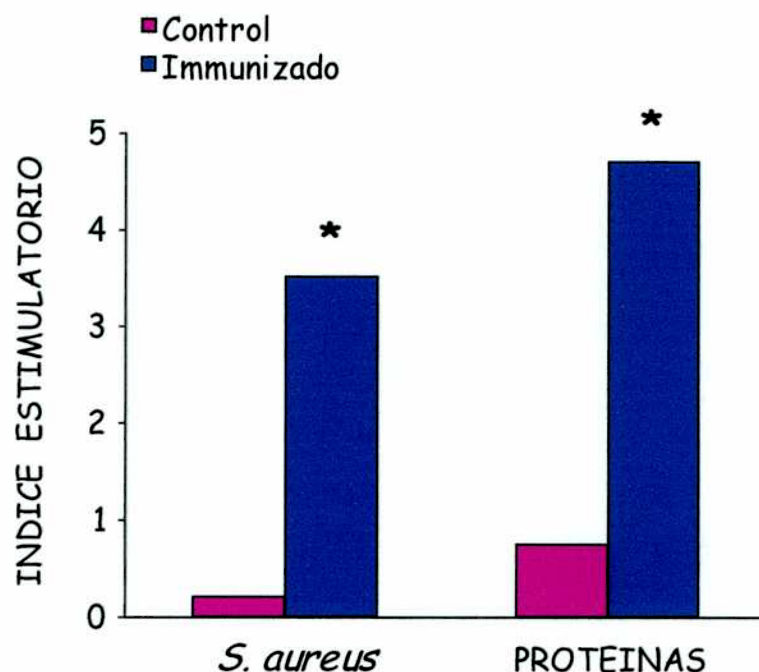


Figura 26. Proliferación celular *in vitro* frente a *S. aureus* o extractos proteicos de la bacteria. Cada barra representa la mediana de los valores de índice estimulador obtenidos para linfocitos provenientes de ratones control e inmunizados al ser cultivados en medio solo o en presencia de antígenos de *S. aureus* (n: 30). (*): $p < 0.05$, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney.

3.8.2. Poblaciones linfocitarias involucradas en la respuesta proliferativa *in vitro* frente al estímulo con *S. aureus*

A fin de identificar las subpoblaciones de linfocitos involucradas en la respuesta *in vitro* frente al estímulo con *S. aureus*, en experimentos posteriores se determinó el porcentaje relativo de $LT\gamma\delta$, células NK, $LT\ CD4^+$ y $LT\ CD8^+$ luego del cultivo de células mononucleares provenientes de los ganglios drenantes de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados en presencia de *S. aureus* (bacteria completa muerta por calor) o medio solo.

3.8.2.1. Expansión de $LT\gamma\delta$

Se evaluó el rol de los $LT\gamma\delta$ en la respuesta secundaria *in vitro* contra *S. aureus* de linfocitos provenientes de ratones inmunizados con la CVA A523. Para ello, se inocularon grupos de ratones hembra con la CVA A523 por la ruta *Ima* durante la última semana de la preñez como se describió previamente

(Fig. 23). Los ratones pertenecientes al grupo control se inocularon con solución salina. Diez días luego de la segunda inoculación se obtuvieron linfocitos de ganglios drenantes de las glándulas L4 y R4 de ratones inmunizados y controles. Las células se cultivaron en presencia de medio solo o de *S. aureus* muerto por calor (10^8 UFC/ml). Luego de 96 h de cultivo se determinó la expansión de los LT $\gamma\delta$ mediante la marcación de antígeno en superficie y posterior análisis por citometría de flujo. No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de LT $\gamma\delta$ presentes luego del cultivo en presencia de *S. aureus* con respecto a medio solo, tanto en células provenientes de ratones inmunizados (Fig. 27 B) como ratones control (Fig. 27 A) ($p > 0.5$).

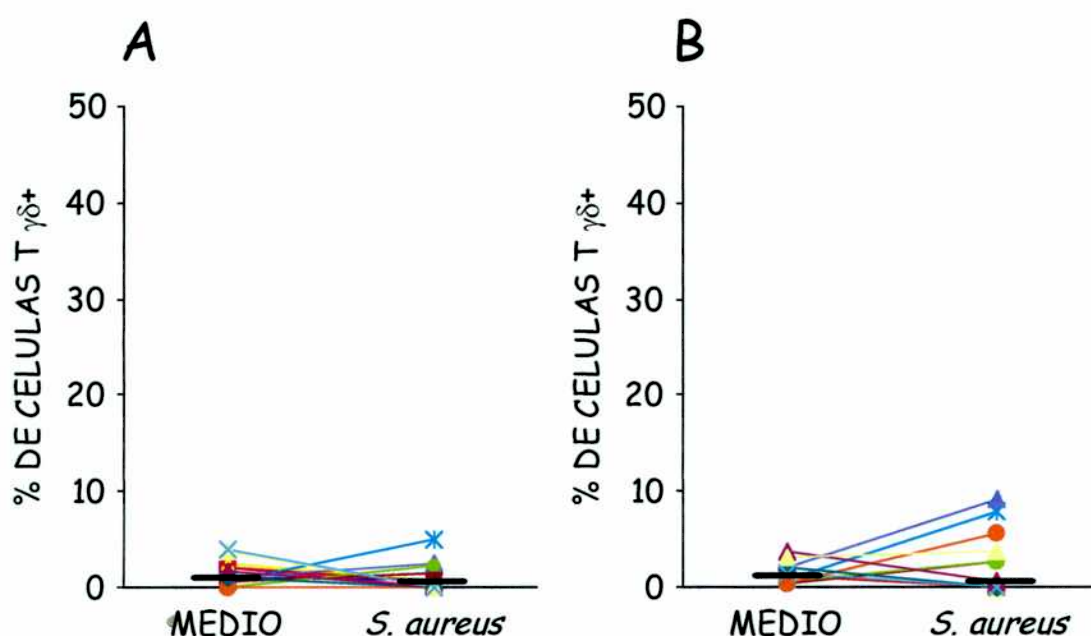


Figura 27. Expansión *in vitro* de LT $\gamma\delta$ en presencia de *S. aureus*. A: células provenientes de ratones control; B: células provenientes de ratones inmunizados. Los linfoblastos se adquirieron en base al perfil de FSC/SSC y se analizaron para la expresión del receptor T $\gamma\delta$. Cada línea conecta el porcentaje de LT $\gamma\delta$ presentes luego del cultivo en presencia de *S. aureus* o medio solo a nivel de ratones individuales. Las líneas negras horizontales indican las medianas obtenidas en cada grupo.

A fin de determinar una posible expansión tardía de los LT $\gamma\delta$ en respuesta al estímulo *in vitro* con *S. aureus*, en otra serie de experimentos se cultivaron las células provenientes de los ganglios linfáticos regionales de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados durante 6 u 8 días en presencia de medio solo o de *S. aureus*. No se observó expansión de LT $\gamma\delta$ en ninguno de los tiempos analizados (Tabla 4).

Tabla 4. Expansión *in vitro* de LT $\gamma\delta$ en presencia de *S. aureus*.

Tiempo	CONTROL		INMUNIZADO	
	Medio	<i>S. aureus</i>	Medio	<i>S. aureus</i>
6 días	1.59 (1-2.46)	3.81 (3.29-4.53)	3.74 (2.4-6.22)	0 (0-2)
8 días	0.33 (0-2.41)	0.77 (0.12-1.45)	1.48 (1.04-3.11)	2.08 (0.74-4.23)

La columna "Tiempo" indica la duración de los cultivos *in vitro*. Se indica la mediana (y rango) del porcentaje de LT $\gamma\delta$ a cada tiempo, para cada grupo.

A fin de descartar la posibilidad de que la ausencia de expansión de LT $\gamma\delta$ se debiera a condiciones inadecuadas de cultivo *in vitro* o a fallas durante la marcación de antígeno en superficie, se realizó un control positivo de expansión de LT $\gamma\delta$ siguiendo un protocolo descrito anteriormente (70). Para ello, se inoculó un grupo de ratones por la ruta *ip* con BCG viable (10^6 UFC/ratón). Siete días más tarde se realizaron lavados peritoneales a los ratones inoculados. Las células recuperadas se caracterizaron mediante marcación en superficie y posterior análisis por citometría de flujo a fin de determinar el porcentaje de linfocitos presentes en peritoneo luego de la inoculación *ip* con BCG. Se observó en promedio una recuperación de LT CD3+ del 20%. Este porcentaje de LT en el peritoneo en respuesta al estímulo con BCG coincidió con el reportado previamente (70). En la Fig. 28 se muestran a modo de ejemplo los histogramas obtenidos a partir de la marcación de células peritoneales provenientes de 2 ratones inoculados con BCG.

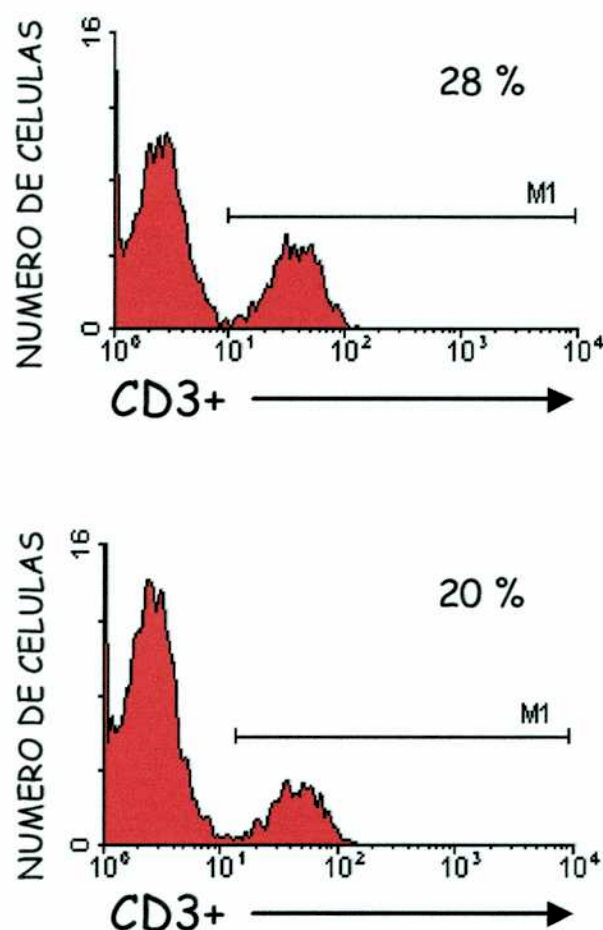


Figura 28. Expresión de CD3 en células peritoneales luego de la inoculación con BCG. M1 indica el porcentaje de células con marcación positiva para CD3.

Las células obtenidas en los lavados peritoneales se cultivaron posteriormente *in vitro* en presencia de PPD (un estímulo que se sabe induce la expansión de $LT\gamma\delta$) en las mismas condiciones de cultivo empleadas en los ensayos anteriores (estimulación *in vitro* con *S. aureus*). Se utilizó PPD a razón de 30 $\mu\text{g/ml}$ o 50 $\mu\text{g/ml}$. Al cabo de 72 h las células se recuperaron y se realizó la marcación en superficie para el receptor $T\gamma\delta$. Se observó una considerable expansión de $LT\gamma\delta$ luego del cultivo con PPD con respecto al número de $LT\gamma\delta$ detectadas al cultivar en presencia de medio solo (Fig. 29 A). Asimismo, la expansión de $LT\gamma\delta$ fue dependiente de la concentración de PPD empleada, confirmando la especificidad del estímulo (Fig. 29 A). Asimismo, en otra serie de experimentos se evaluó la capacidad de los $LT\gamma\delta$ provenientes de los ganglios

linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ser expandidas *in vitro*. Para ello, se inoculó un grupo de ratones por la ruta *Ima* con BCG viable (10^6 UFC/mama) el día 10 post-parto. Siete días más tarde se obtuvieron células mononucleares de los ganglios linfáticos drenantes de las glándulas L4 y R4, las cuales se cultivaron *in vitro* en presencia de PPD (15 $\mu\text{g/ml}$ ó 30 $\mu\text{g/ml}$). Al cabo de 72 h se recuperaron las células y se realizó la marcación en superficie para el receptor $\text{T}\gamma\delta$. Al igual que en el caso de las células peritoneales, se observó una considerable expansión de los $\text{LT}\gamma\delta$ luego del cultivo con PPD con respecto al porcentaje de $\text{LT}\gamma\delta$ en medio solo (Fig. 29 B). Nuevamente, la expansión de $\text{LT}\gamma\delta$ fue dependiente de la concentración de PPD utilizada (Fig. 29 B). En la Fig. 29 C se observa, a modo de ejemplo, la expresión del receptor $\text{T}\gamma\delta$ luego del cultivo de células provenientes de los ganglios drenantes de la glándula mamaria de uno de los ratones analizados.

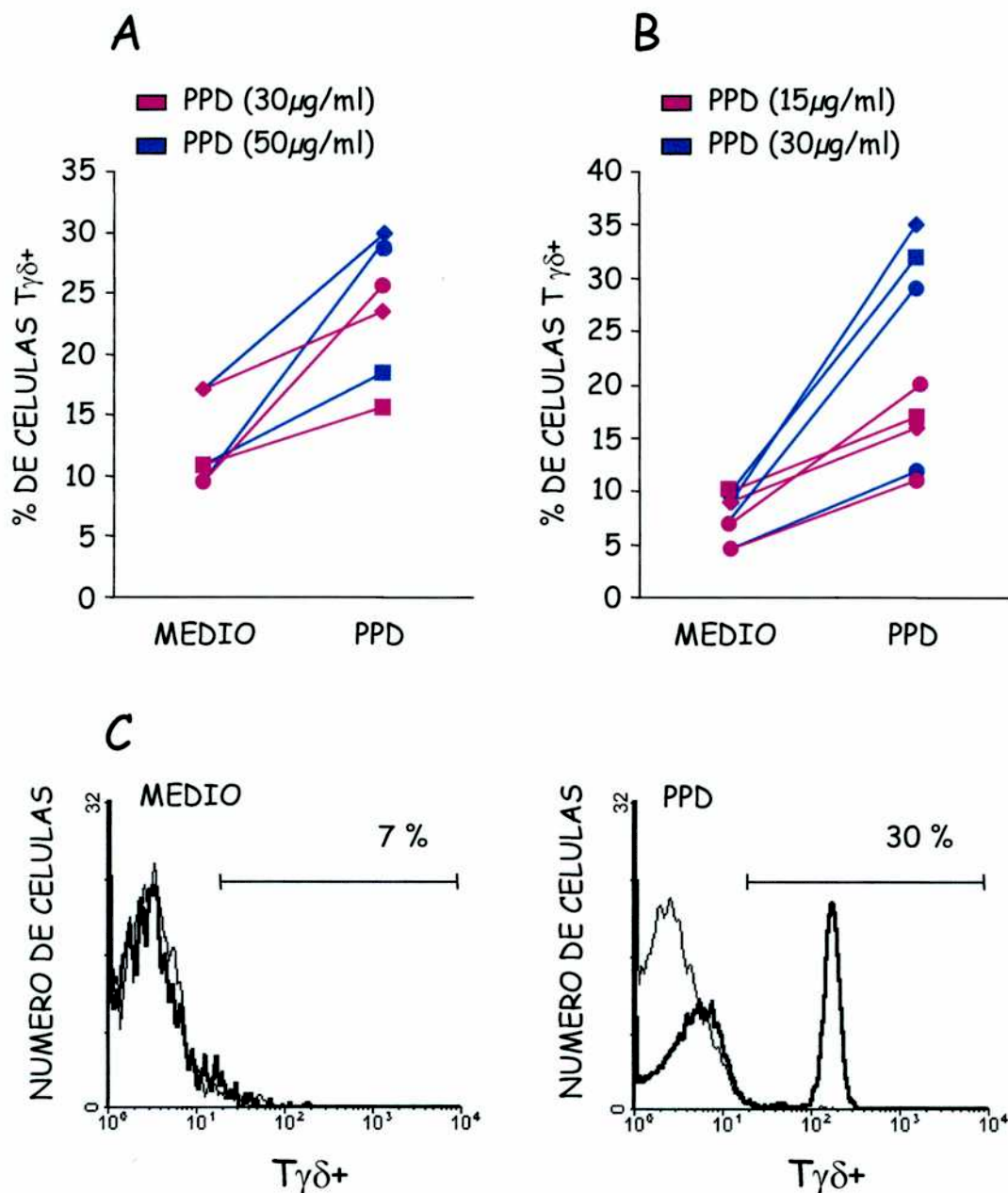


Figura 29. Expansión de $LT\gamma\delta$ frente al estímulo *in vitro* con PPD. A: células peritoneales de ratones inoculados con BCG por la ruta *ip*; B: células de ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones inoculados con BCG por la ruta *Ima*. Cada línea indica la expresión del receptor $T\gamma\delta$ obtenida cuando las células se cultivaron en presencia de medio solo o PPD a nivel de ratones individuales. C: Porcentaje de $LT\gamma\delta$ luego del cultivo en presencia de medio (histograma izquierdo) o PPD 30 $\mu\text{g/ml}$ (histograma derecho). Histograma de línea gruesa: anticuerpos específicos para el receptor $T\gamma\delta$, histograma de línea delgada: anticuerpos irrelevantes.

3.8.2.2. Expansión de células NK, LT CD4+ y LT CD8+

Se evaluó el rol de las células NK en la respuesta secundaria *in vitro* contra *S. aureus*. Células mononucleares de ganglios provenientes de ratones inmunizados con la CVA A523 y control se estimularon *in vitro* como se describió en el ítem anterior. Luego de 96 h de cultivo se determinó el porcentaje de células NK por marcación en superficie y posterior análisis por citometría de flujo. No se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de células NK (CD3+ o CD3-) presentes luego del cultivo en presencia de *S. aureus* con respecto a medio solo, tanto en células provenientes de ratones inmunizados (Medio: 3% [rango: 0%-4.3%], *S. aureus*: 6.9% [rango:6.04%-6.99%], $p > 0.5$) como ratones control (Medio: 1.5% [rango: 0.65%-2%], *S. aureus*: 3.44% [rango:0.98%-5.92%], $p > 0.5$). El porcentaje relativo de LT CD4+ y LT CD8+ luego del cultivo en presencia de medio o de *S. aureus* fue similar al determinado antes de la estimulación *in vitro* (ítem 4.7., Fig. 20).

3.8.3. Producción de citoquinas luego del estímulo *in vitro* con *S. aureus*.

A fin de caracterizar el tipo de respuesta desarrollada por los linfocitos provenientes de ratones control e inmunizados frente al estímulo con *S. aureus*, se determinó la producción *in vitro* de IFN- γ e IL-4. Para ello, células mononucleares de los ganglios linfáticos drenantes de las glándulas L4 y R4 de ratones inmunizados con la CVA A523 (de acuerdo al plan de inmunización III, Fig. 23) se cultivaron en presencia de *S. aureus* (bacteria completa muerta por calor), proteínas de *S. aureus* o medio solo. Luego de 72 h se recolectó el sobrenadante de los cultivos y se determinó la presencia de IFN- γ e IL-4 mediante la técnica de ELISA. Se observó un aumento significativo en la producción de IFN- γ por las células provenientes de ratones inmunizados al ser cultivados en presencia de *S. aureus* (Fig. 30 A, panel derecho, $p < 0.001$) o de extractos proteicos de la bacteria (Fig. 30 B, panel derecho, $p < 0.05$). Por el contrario, no se detectó producción de IFN- γ por células provenientes de ratones control (Fig. 30 A, B, panel izquierdo, $p > 0.5$). No se detectó la producción de

IL-4 en el sobrenadante de ninguno de los diferentes cultivos celulares realizados (resultados no mostrados). La presencia de esta citoquina fue en efecto demostrada mediante la técnica de ELISA cuando se realizaron cultivos en presencia de Concanavalina A (Con A) (control positivo, resultados no mostrados).

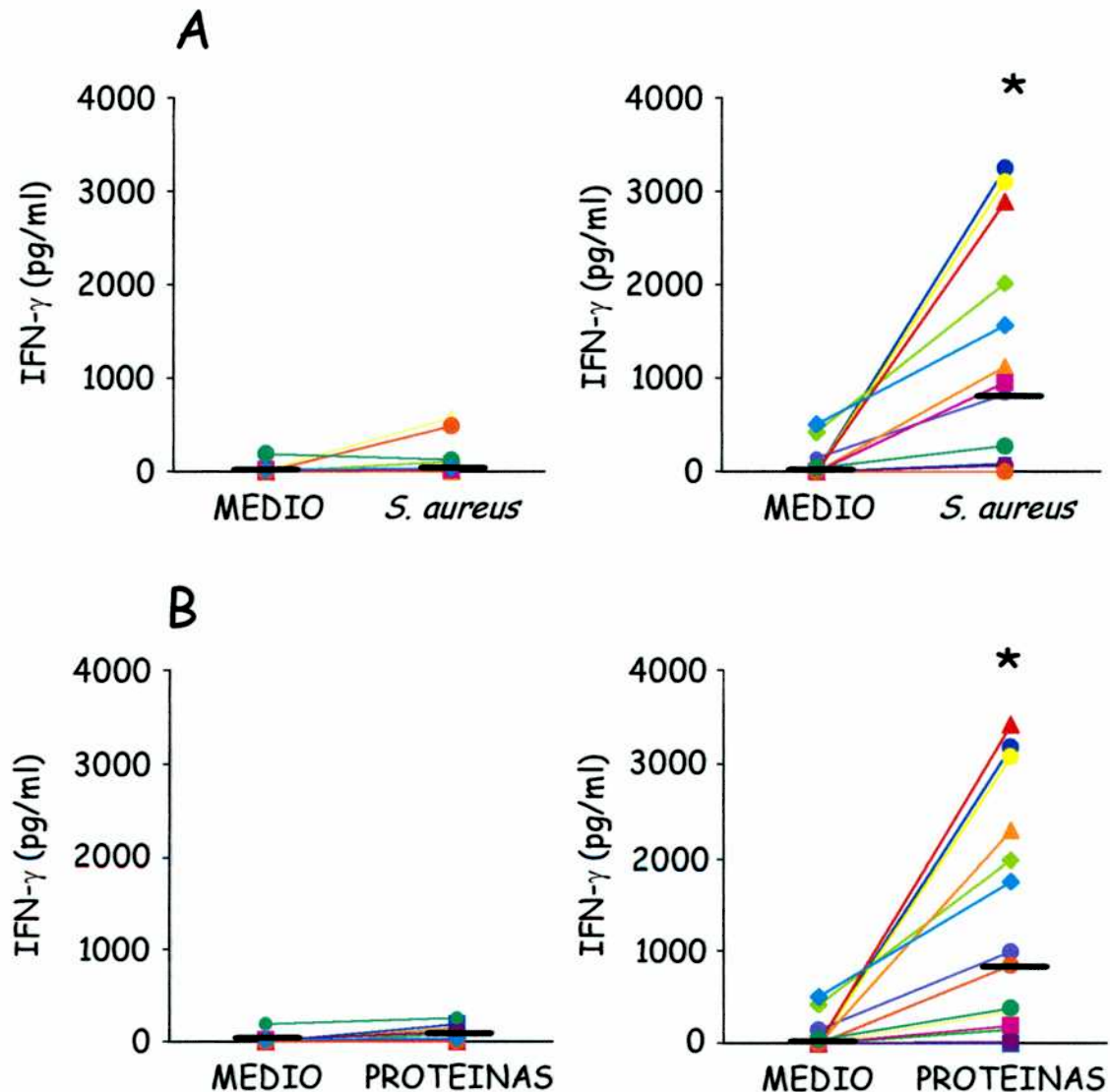


Figura 30. Efecto de la inmunización *Ima* con la CVA A523 sobre la producción *in vitro* de IFN- γ . Cada línea conecta el nivel de IFN- γ producido en presencia de *S. aureus* o medio solo (A) o en presencia de proteínas de *S. aureus* o medio solo (B) a nivel de ratones individuales. Las líneas negras horizontales indican la mediana del IFN- γ producido por cada grupo. El nivel de significación se determinó mediante el Test de Wilcoxon para muestras pareadas comparando la mediana del IFN- γ producido luego de la estimulación con *S. aureus* (A) o proteínas de *S. aureus* (B) vs. la mediana del IFN- γ producido en medio solo (A, B), (*): $p < 0.001$. La figura muestra los resultados de un experimento representativo de 3 realizados.

A fin de caracterizar las subpoblaciones de linfocitos involucradas en la producción de IFN- γ durante el cultivo *in vitro* con *S. aureus*, se realizó la detección de IFN- γ intracelular en LT CD4+, LT CD8+, LT $\gamma\delta$ y células NK. En experimentos preliminares se realizó la puesta a punto de la técnica de detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo en linfocitos de ratón. Para ello se utilizaron células provenientes de los ganglios drenantes de la glándula mamaria de ratones control (no inmunizados). Las células se cultivaron en presencia de medio solo o se estimularon con Con A (2 μ g/ml) para inducir la producción de citoquinas de manera inespecífica. Luego de 24 h de cultivo se realizó la marcación de antígenos de superficie (CD3 y CD25) y la marcación para citoquinas intracelulares. En la Fig. 31 se muestra la activación de los LT luego del cultivo en presencia de Con A (histograma color rojo) con respecto a las células cultivadas en medio solo (histograma color verde).

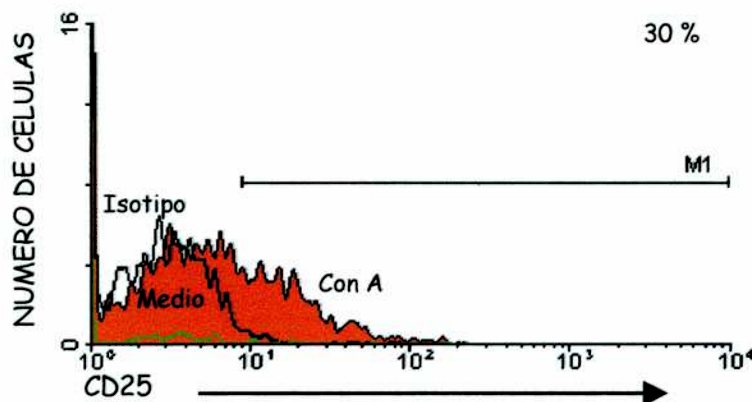


Figura 31. Activación de LT luego del cultivo *in vitro* con Con A. Los linfoblastos se adquirieron en base a su perfil de FSC/SSC y se determinó la expresión de CD25 por LT CD3+. M1 indica el porcentaje de células con marcación positiva para CD25 en cultivos realizados en presencia de Con A (área roja) con respecto al control isotípico (curva color negro) y a las células cultivadas en medio (curva color verde).

El análisis de la presencia de citoquinas intracelulares mostró un aumento pequeño en el porcentaje de LT CD3+ productores de IFN- γ (6,47%) luego del estímulo con Con A, en comparación con el porcentaje de LT CD3+ productores de IFN- γ luego del cultivo en medio solo (1,55 %). Por lo tanto, considerando que el porcentaje de linfocitos productores IFN- γ detectado fue bajo, se realizó un

nuevo experimento en el cual las células se estimularon con Con A durante 48 h. Al cabo de ese tiempo se evaluó la expresión de IFN- γ empleando diferentes concentraciones de anticuerpo específico a fin de determinar las mejores condiciones para la detección de dicha citoquina. En la Fig. 32 se observa la expresión de IFN- γ por LT CD4⁺ estimulados con Con A. La detección de LT CD4⁺ productores de IFN- γ resultó máxima al emplear 2.5 μ g de anticuerpo/10⁶ células (34 %, Fig. 32, panel D).

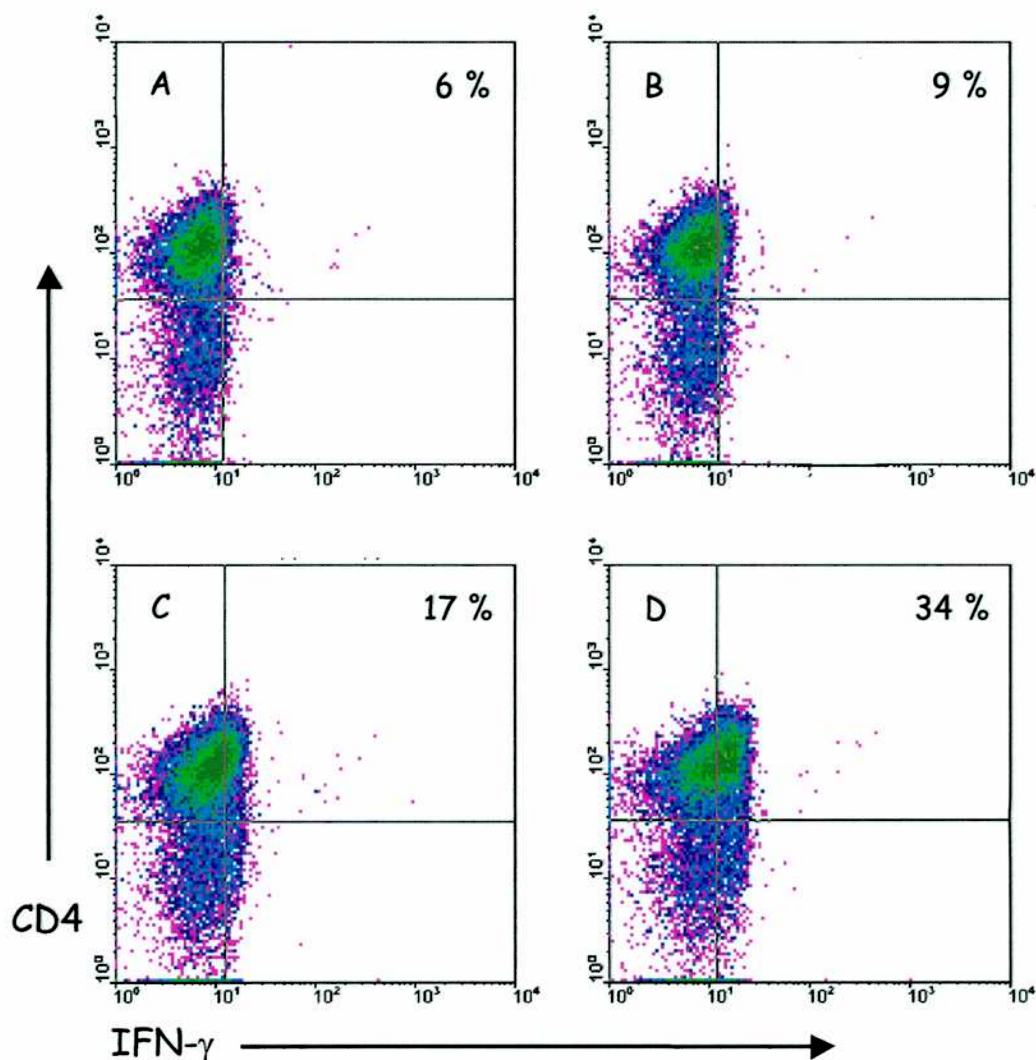


Figura 32. Detección de IFN- γ intracelular por citometría de flujo. A: control isotópico; B-D: anticuerpo anti-IFN- γ 0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml y 2,5 μ g/ml respectivamente. Los linfoblastos se adquirieron en base a su perfil de FSC/SSC y se determinó la expresión de IFN- γ por LT CD4⁺.

Luego de establecer las condiciones óptimas para la detección de IFN- γ intracelular, se procedió a determinar la producción de esta citoquina por

linfocitos provenientes de ratones control e inmunizados por la ruta *Ima* (plan de inmunización III, Fig. 13) con la CVA A523, luego de su estimulación específica *in vitro*. Diez días luego de la segunda inoculación se obtuvieron células mononucleares de ganglios linfáticos drenantes de las glándulas L4 y R4, las cuales se cultivaron en presencia de medio solo o *S. aureus*, como se describió previamente (Fig. 23). Luego de 72 h de cultivo se realizó la marcación doble para antígenos de superficie (CD4, CD8, receptor $T\gamma\delta$, DX5 [células NK]) e IFN- γ intracelular. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de LT CD4+ productores de IFN- γ cuando las células provenientes de los ganglios drenantes de la glándula mamaria de los ratones inmunizados se cultivaron en presencia de *S. aureus* (Fig. 33 B, $p < 0.01$). Por el contrario, el estímulo *in vitro* con *S. aureus* no indujo la producción de IFN- γ por linfocitos provenientes de ratones control (Fig. 33 A, $p > 0.5$).

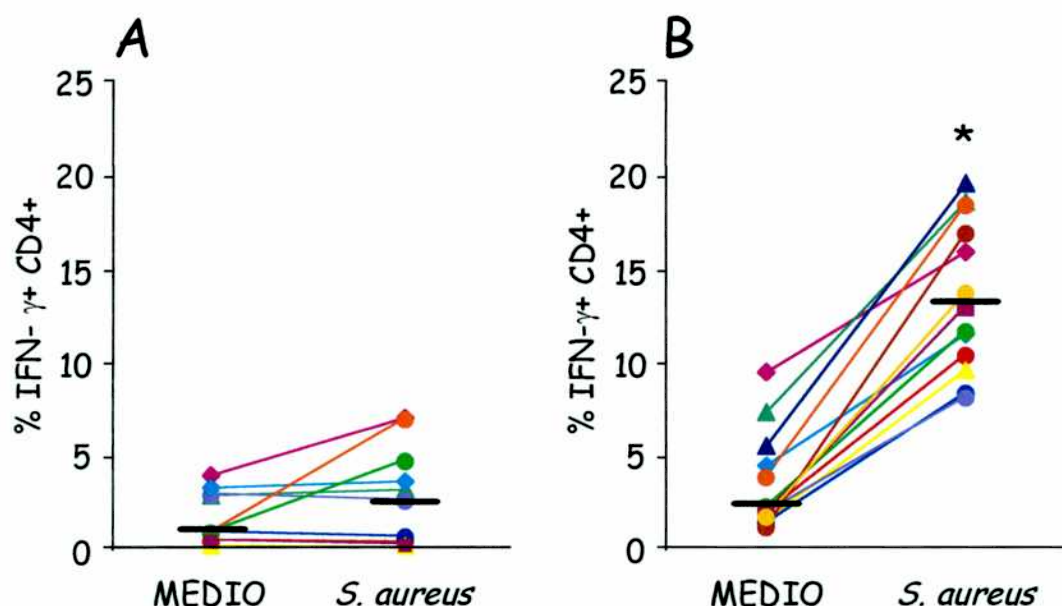


Figura 33. Producción de IFN- γ por LT CD4+ en respuesta al estímulo *in vitro* con *S. aureus*. Se realizó la adquisición de los linfoblastos en base a su perfil de FSC/SSC y una posterior adquisición en base a la expresión de CD4. Cada línea indica el porcentaje de LT CD4+ productores de IFN- γ determinado cuando las células provenientes de ratones control (A) e inmunizados (B) se cultivaron en presencia de medio o *S. aureus*. Las líneas negras horizontales indican la mediana del porcentaje de LT CD4+ productores de IFN- γ en cada grupo. El nivel de significación se determinó mediante el Test de Wilcoxon para muestras pareadas, comparando la mediana del porcentaje de células CD4+IFN- γ + luego de la estimulación con *S. aureus* vs. la mediana del porcentaje de dichas células en medio solo, (*): $p < 0.01$.

No se detectó producción significativa de IFN- γ por ninguna de las otras poblaciones linfocitarias evaluadas (LT CD8+, LT $\gamma\delta$ y células NK, resultados no mostrados). Asimismo, y en concordancia con los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA, no se detectó producción de IL-4 por ninguna de las poblaciones en estudio (resultados no mostrados). Sin embargo, pudo detectarse producción de IL-4 por LT CD4+ cuando las células mononucleares de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria se cultivaron en presencia de Con A (2 μ g/ml) (Fig. 34).

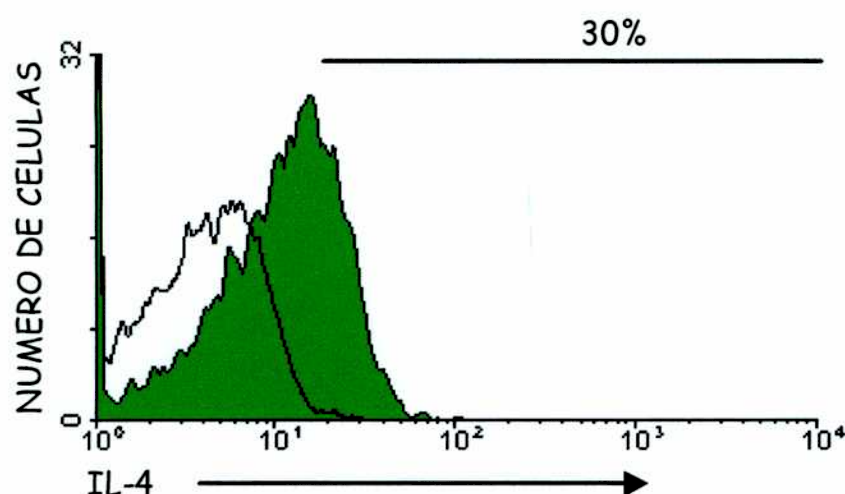


Figura 34. Producción de IL-4 por LT CD4+ en respuesta al estímulo *in vitro* con Con A. Histograma claro: control isotípico; histograma verde: anticuerpo anti-IL-4. Los linfoblastos se adquirieron en base a su perfil de FSC/SSC y se determinó la expresión de IL-4 por LT CD4+.

3.8.4. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en esta etapa de la investigación permitieron demostrar que la inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo la sensibilización de linfocitos de la glándula mamaria capaces de responder frente a un estímulo secundario *in vitro* por *S. aureus*. Esto se evidenció por un aumento en la respuesta proliferativa *in vitro* así como por la producción de IFN- γ . Los LT CD4+ serían la principal población involucrada durante esta respuesta.

3.8.5. Efecto de la inmunización *Ima* con la CVA A523 sobre la respuesta inmune mediada por células en la glándula mamaria durante la infección por *S. aureus*

Posteriormente, se caracterizaron las poblaciones linfocitarias presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria durante la infección experimental con *S. aureus* en ratones inmunizados con la CVA A523 y ratones control. Para ello, se inocularon grupos de ratones hembra con la CVA A523 por la ruta *Ima* durante la última semana de la preñez (días -7 y 0, exp III, Fig. 13, Fig 35). Los ratones pertenecientes al grupo control se inocularon con solución salina. Diez días luego de la segunda inoculación los ratones pertenecientes a ambos grupos se desafiaron por la ruta *Ima* con 5×10^5 UFC de la cepa virulenta parental de *S. aureus*. A diferentes tiempos luego del desafío (0, 6 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 14 días) se obtuvieron células mononucleares de los ganglios drenantes de la glándula mamaria, se realizó el recuento de células totales y se caracterizaron las poblaciones de linfocitos presentes mediante marcación de antígenos de superficie y posterior análisis por citometría de flujo (Fig. 35).

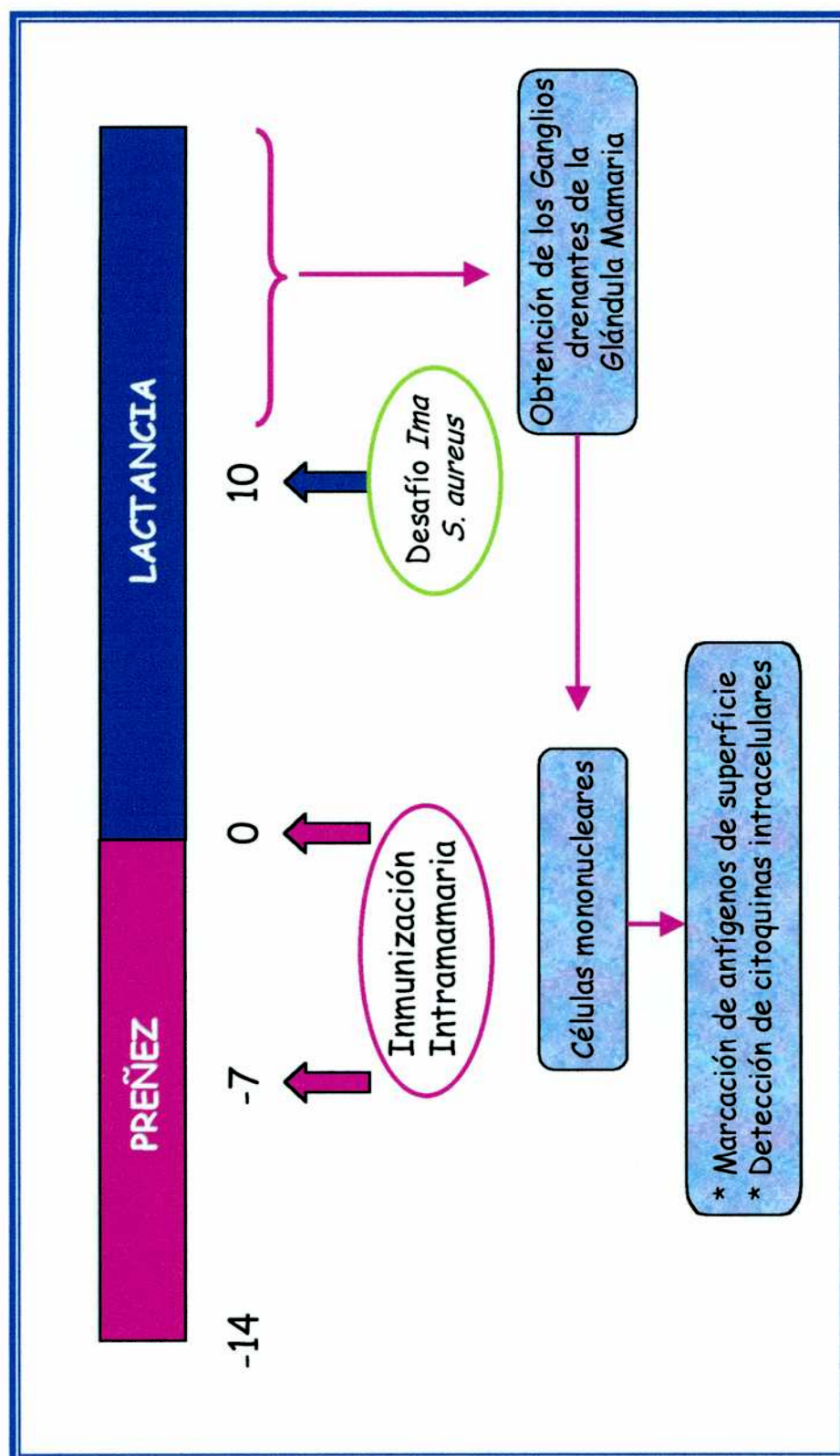


Figura 35. Caracterización de la respuesta inmune mediada por células durante la infección por *S. aureus*

Al momento de realizar el desafío *Ima*, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el número total de células presentes en ganglios regionales de la glándula mamaria de ratones inmunizados (Tabla 5). Posteriormente, el número total de células aumentó como consecuencia de la infección experimental tanto en ratones control como en el grupo inmunizado (Tabla 5).

Tabla 5. Recuento de células mononucleares en los ganglios regionales de la glándula mamaria.

Día post-parto	Tiempo	Control	Control Desafiado	Inmunizado Desafiado
10	0	1.99×10^6	1.99×10^6	5.25×10^6 ^(a)
12	2	4.2×10^6	4.75×10^6	1.02×10^7
16	6	2.2×10^6	8×10^6 ^(*)	2.14×10^7 ^(*)
24	14	2×10^6	1.53×10^7 ^(*)	1.12×10^7 ^(*)

Se indica la mediana del número absoluto de células obtenidas en cada grupo (n: 8). La columna tiempo indica los días luego del desafío a los cuales se obtuvieron las células. El grupo control consistió de hembras en período de lactancia no desafiadas con *S. aureus*. (a): $p < 0.05$, comparado con el grupo control y el grupo control desafiado; (*): $p < 0.05$, comparado con el grupo control, Test de Mann-Whitney.

Al evaluar las poblaciones de linfocitos en cada grupo, se detectó un aumento significativo en el porcentaje relativo de LT CD8+ presentes en ganglios drenantes de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados a los 2, 6 y 14 días luego del desafío *Ima* con la cepa virulenta de *S. aureus* (Tabla 6, $p < 0.05$). En concordancia, se observó una disminución significativa en el porcentaje relativo de LT CD4+ en los ganglios de ratones control e inmunizados a los 2, 6 y 14 días luego del desafío *Ima* con la cepa virulenta de *S. aureus* (resultados no mostrados). Estos cambios, también se observaron durante la lactancia en los ratones control no inoculados con *S. aureus* (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la inmunización *Ima* en el porcentaje de LT CD8+ en los ganglios linfáticos regionales de la glándula mamaria.

Día post-parto	Tiempo	Control	Control Desafiado	Inmunizado Desafiado
10	0	10 (4-16)	10 (6-17)	12 (7-16)
12	2	15 (13-20)	23 ^a (11-28)	19 ^a (12-30)
16	6	23 ^a (16-27)	29 ^a (8-36)	20.5 ^a (11-32)
24	14	15 (12-25)	19.5 ^a (15-24)	23.6 ^a (14-32)

Se indica la mediana (y el rango) del porcentaje de LT CD8+ a cada tiempo para cada grupo (n: 8). La columna tiempo indica los días luego del desafío a los cuales se obtuvieron las células. El grupo control consistió de hembras en período de lactancia no desafiadas con *S. aureus*. (a): $p < 0.05$, Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney.

No se hallaron diferencias significativas en los porcentajes de LT $\gamma\delta$ y células NK presentes en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones control e inmunizados luego del desafío *in vivo* con *S. aureus* (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la inmunización *Ima* sobre la expansión temprana de LT $\gamma\delta$ y células NK luego del desafío con *S. aureus*.

Tiempo post-desafío	LT $\gamma\delta$		NK	
	Control	Inmunizado	Control	Inmunizado
0	0.13 (0-4.7)	2.28 (0.4-4.9)	2.28 (1.6-2.9)	2.09 (1.5-2.7)
2	2.91 (2.8-5.2)	3.53 (2.1-3.6)	1.01 (0.95-1.1)	1.1 (0.9-2.4)
4	4.9 (3.9-6)	5.53 (3.8-7.7)	3.5 (3-3.9)	2.27 (1.7-2.9)

Se indica la mediana (y rango) del porcentaje relativo de células determinado a cada tiempo para cada grupo (n: 8).

Finalmente, a fin de evaluar el efecto de la inmunización local sobre la respuesta de LT de la glándula mamaria que pudiesen estar involucrados en la erradicación de *S. aureus*, se determinó la producción de IFN- γ por LT CD4+ y LT CD8+ de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria. Se inmunizaron grupos de ratones hembra por la ruta *Ima* como se describió anteriormente (Fig. 35) y posteriormente se desafiaron con la cepa virulenta de *S. aureus*. Dos y 6 días luego del desafío *Ima* se obtuvieron células mononucleares de los ganglios regionales y se determinó el porcentaje de LT CD4+ y LT CD8+ productores de IFN- γ por citometría de flujo. El análisis de los LT CD4+ y LT CD8+ a nivel individual reveló que ambas poblaciones provenientes de ratones inmunizados produjeron IFN- γ luego del desafío experimental con *S. aureus*. Seis días luego del desafío con *S. aureus* se observó un aumento significativo en el porcentaje de LT CD4+ (Fig. 36 A, $p < 0.01$) y LT CD8+ (Fig. 36 B, $p < 0.01$) productores de IFN- γ provenientes de ratones inmunizados, que no se observó en los linfocitos de los ganglios provenientes de ratones control. Mas aún, se observó un aumento significativo en la producción de IFN- γ por LT CD8+ de ratones inmunizados 2 días después del desafío *Ima* con *S. aureus* (Fig. 36 B, $p < 0.05$).

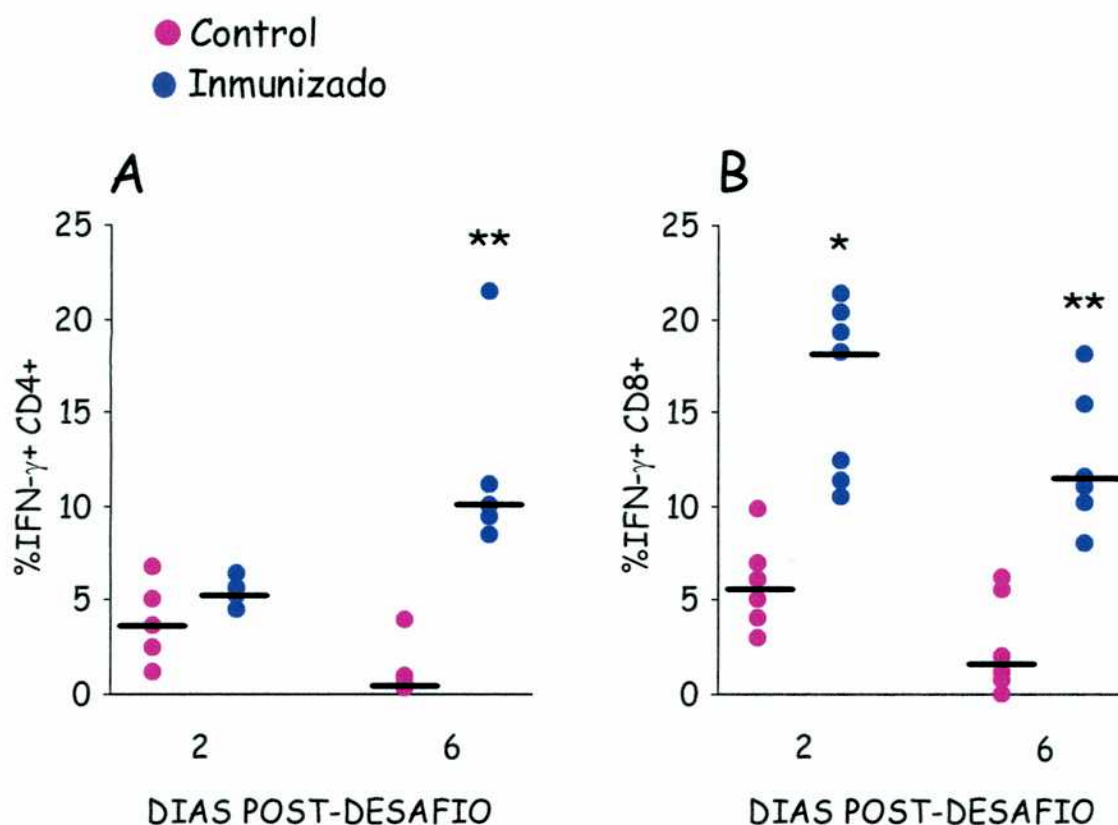


Figura 36. Efecto de la inmunización *Ima* sobre la producción de IFN- γ *in vivo* durante la infección por *S. aureus*. A: producción de IFN- γ por LT CD4+; B: producción de IFN- γ por LT CD8+. Las líneas negras horizontales indican la mediana del porcentaje de LT CD4+ o LT CD8+ productores de IFN- γ en cada grupo. El nivel de significación se determinó por medio del Test de Suma de Rangos de Mann-Whitney, comparando la mediana del porcentaje de LT CD4+ o LT CD8+ productores de IFN- γ en ratones inmunizados vs. el porcentaje de dichas células en ganglios de ratones control a cada tiempo analizado, (*): $p < 0.05$, (**): $p < 0.01$.

3.8.6. Conclusiones parciales

La inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo una respuesta inmune mediada por células en la glándula mamaria. Durante la infección *Ima* experimental por *S. aureus*, se observó producción de IFN- γ por LT CD4+ y LT CD8+ de ratones inmunizados. La producción de IFN- γ podría jugar un rol fundamental en la erradicación de *S. aureus* que alcancen el medio intracelular.

4. Discusión

La infección intramamaria (*Ima*) constituye la patología infecciosa más prevalente de los bovinos destinados a la lechería (115, 161, 184). A nivel mundial esta enfermedad causa pérdidas anuales de alrededor de 35 mil millones de dólares (56) y en nuestro país las pérdidas para la industria lechera se estiman en los 200 millones de pesos anuales (8).

En la mayoría de los estudios realizados para la evaluación de potenciales vacunas que permitan prevenir las infecciones *Ima* por *Staphylococcus aureus*, el criterio práctico de aplicación de la vacuna ha prevalecido por sobre la adquisición de información básica respecto a los mecanismos inmunes que debieran ser estimulados para lograr la protección de la glándula mamaria frente a esta bacteria. Esto podría constituir una de las principales razones para explicar la falta de resultados exitosos. En casi todos esos estudios se administró la vacuna por la vía parenteral, a pesar del conocimiento de que la inmunidad a nivel de las mucosas podría ser inducida más efectivamente mediante la inmunización local. De esta manera, se puso gran énfasis en aumentar mediante la vacunación los niveles de anticuerpos en suero, sin considerar la necesidad de contar con efectores de la respuesta inmune adaptativa local que pudieran actuar rápidamente luego del ingreso de la bacteria a la glándula, como por ejemplo anticuerpos específicos para neutralizar toxinas o para impedir la adherencia y la colonización. Asimismo, los inmunógenos fueron elegidos considerando sólo algunos de los factores de patogenicidad de *S. aureus* que podrían estar involucrados en las infecciones *Ima*. Más aún, a pesar de las evidencias que indican que la susceptibilidad para las infecciones *Ima* está fuertemente correlacionada con funciones celulares disminuidas en la glándula mamaria y que *S. aureus* es capaz de sobrevivir en forma intracelular, nunca se consideró la necesidad de inducir inmunidad mediada por células para prevenir las infecciones por *S. aureus*.

La hipótesis de este trabajo de investigación propone que la administración de una vacuna viva atenuada por la ruta local *Ima* sería un método idóneo para incrementar la eficacia de la respuesta inmune adaptativa, tanto humoral como mediada por células, en la glándula mamaria contra *S. aureus*. Asimismo se postula que el período durante la preñez o la lactancia en el cual se debe

administrar la vacuna debe ser cuidadosamente determinado, a fin de inducir la respuesta inmune protectora más eficiente en la glándula mamaria.

En este trabajo, utilizando un modelo murino de mastitis, se demostró que la inmunización con una cepa viva atenuada (CVA) prototípica de *S. aureus* (CVA A523), por la ruta local *Ima* durante la etapa final de la preñez, confirió protección en la glándula mamaria frente a la infección experimental. La protección se evidenció a través de una significativa reducción en el número de UFC remanentes en la glándula mamaria de los ratones inmunizados luego del desafío experimental con la cepa virulenta parental de *S. aureus*. La protección inducida mediante la inmunización se correlacionó con la presencia de elevados niveles de IgA e IgG en leche así como también con la presencia de poblaciones de linfocitos T (LT) capaces de producir IFN- γ frente al estímulo *in vitro* o durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.

Diversos antígenos de *S. aureus* se han considerado para el desarrollo de una vacuna. Entre ellos, las preparaciones de la bacteria completa muerta por calor o por tratamiento con formalina fueron las más utilizadas, seguidas por las vacunas a subunidades compuestas por extractos antigénicos (tales como preparaciones de polisacárido capsular) y exotoxinas de *S. aureus* inactivadas con formalina (175, 177, 178, 187). Otros investigadores, sin embargo, han sugerido que el control de la respuesta inmune y la seguridad de una vacuna podrían ser más fácilmente alcanzados por utilización de antígenos bacterianos seleccionados, purificados y bien caracterizados, en lugar de preparaciones crudas de la bacteria completa (161). En relación con este tipo de inmunógenos, Mamo *et al.* demostraron que una porción relativamente pequeña de la FnBP inducía protección considerable frente al desafío con *S. aureus* en un modelo experimental (95). Independientemente de su composición, todas las vacunas propuestas hasta el momento han presentado baja eficacia cuando se las evaluó en ensayos de campo (184). El escaso éxito de dichas vacunas podría deberse, entre otros motivos, a la falta de conocimiento acerca de tanto los antígenos relevantes de *S. aureus* que estarían involucrados en la protección de la glándula mamaria, como de las respuestas inmunes que es necesario inducir en la glándula mamaria para lograr la erradicación de *S. aureus*.

La hipótesis de trabajo de esta investigación propone asimismo, que la prevención de la invasión de la glándula mamaria por *S. aureus* puede ser lograda utilizando una CVA como inmunógeno. En este sentido, vale la pena recordar el axioma que asegura que el agente causal de la infección natural conferiría la mejor protección en comparación con cualquier otro inmunógeno. Una vacuna viva atenuada contiene todos los determinantes antigénicos del patógeno, resultando por lo tanto un candidato promisorio para ser utilizado como inmunógeno. Asimismo, una de las ventajas de utilizar una cepa capaz de replicar *in vivo* es que debido a la multiplicación bacteriana la exposición de antígenos a las células de los ganglios linfáticos regionales sería mayor, incrementándose así la sensibilización de los linfocitos (79). Otra ventaja importante de la utilización de una CVA es que, durante el tiempo que ésta permanece en la mucosa, podría expresar todos los antígenos del patógeno salvaje en su conformación natural, incluidos aquellos antígenos que sólo se expresan *in vivo* (102). Más aún, en estudios previos se ha demostrado la capacidad de vacunas vivas atenuadas de conferir protección al ser administradas por la ruta local (86, 171).

Entre los diferentes métodos propuestos para la atenuación de patógenos bacterianos, la potencialidad de los mutantes termosensibles (*ts*) bacterianos ha sido ampliamente investigada. Asimismo, se ha establecido experimentalmente la eficacia de cepas *ts* de diversas especies bacterianas para inducir protección contra el desafío por la cepa virulenta (53, 66, 67, 152). Las cepas *ts* ofrecen diversas ventajas específicas frente a otras cepas atenuadas por medios genéticos o fisicoquímicos. En primer lugar, las cepas mutantes *ts* con lesiones en genes que codifican para productos esenciales no pueden desarrollar indefinidamente a la temperatura restrictiva en ningún ambiente nutricional. En segundo lugar, los antígenos de superficie permanecen intactos y la inmunogenicidad no está comprometida. Asimismo, el método utilizado para aislar mutantes *ts* puede ser manipulado para producir cepas que replican hasta un grado limitado (mutantes de replicación limitada) reproduciendo, al ser utilizados como vacuna, los estadios iniciales de la infección natural. En el presente trabajo, se obtuvieron cepas *ts* de fenotipo replicante en base a estudios previos de nuestro laboratorio con mutantes *ts* de *Pseudomonas aeruginosa*, en los que se demostró una mayor eficacia de

cepas de este fenotipo para otorgar protección en comparación con las cepas de fenotipo no replicante (152).

Entre las cepas *ts* de fenotipo replicante obtenidas, en el presente trabajo se utilizó la CVA A523, la cual presentó un fenotipo de replicación limitada. Se demostró la capacidad de esta cepa de persistir en la glándula mamaria durante al menos 4 días luego de finalizado el plan de vacunación. La capacidad de esta cepa de replicar por sólo un período limitado en la glándula permitiría la inducción de una respuesta inmune al mimetizar los estadios iniciales de la infección natural pero sin provocar la enfermedad. En este sentido, al evaluar la potencial utilidad de una vacuna para la prevención de las infecciones *Ima*, es importante considerar que además de inducir una respuesta inmune protectora, el inmunógeno utilizado no debería provocar efectos adversos en la glándula mamaria tales como inflamación severa, daño en el tejido secretorio o compromiso de la producción de leche (161). Los estudios de permanencia de la CVA A523 en la glándula mamaria indicaron que dicha cepa fue completamente depurada a los siete días luego de una o dos inoculaciones por la ruta *Ima*. Estos resultados evidenciaron una permanencia transitoria de la CVA A523 en la glándula mamaria en comparación con la permanencia de la cepa virulenta parental (21 días). En el presente trabajo se demostró asimismo, que la administración local de la CVA A523 no inducía modificaciones en el recuento de células somáticas en la leche ni en el volumen de leche producido. La permanencia transitoria de la CVA A523 junto con la ausencia de signos de inflamación y daño del epitelio secretorio, indicó la factibilidad de utilizar esta cepa como prototipo de una vacuna viva atenuada en los estudios de protección de la glándula mamaria.

Existen diversos métodos de atenuación, los cuales pueden ser aplicados a diferentes cepas parentales de *S. aureus*. Dada la potencialidad de muchas de estas CVA de funcionar adecuadamente como vacunas, es necesario un proceso de selección de aquellas que presenten las características más apropiadas. Por lo tanto, es imprescindible contar con modelos animales que permitan definir el fenotipo de la cepa mutante apropiada. En este sentido, resulta apropiado utilizar un modelo experimental desarrollado en un animal pequeño que pueda ser manejado fácilmente

en el laboratorio. El modelo de infección de la glándula mamaria murina descrito en este estudio ofrece la posibilidad de realizar experimentos con un gran número de animales. Dado el pequeño tamaño de las glándulas, también fue posible estudiar el desarrollo bacteriológico durante la infección *in vivo* utilizando la glándula completa. Asimismo, el uso del procedimiento de obtención de leche descrito en este trabajo ofreció varias ventajas con relación a otros métodos descritos anteriormente (97, 127). En este modelo no fue necesario remover los pezones para la recolección de leche como se describió previamente (127), lo cual permitió reunir satisfactoriamente las crías con sus madres luego de recolectada la leche. Asimismo, el volumen de leche recuperado fue lo suficientemente grande tan pronto como 2 horas luego de separar las crías de las madres. El uso del modelo murino de mastitis permitió asimismo evaluar la respuesta inmune celular frente a *S. aureus* inducida por la inmunización a nivel de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria. Con excepción de algunos estudios (147, 148), en la mayoría de los trabajos realizados con bovinos, tendientes a caracterizar las poblaciones celulares involucradas y las citoquinas producidas durante la infección *Ima*, se emplearon células provenientes de leche o de sangre periférica (63, 80, 138, 139, 164). Sin embargo, las células obtenidas de la leche, y más aún las de sangre periférica, pueden no necesariamente reflejar la verdadera respuesta inmune que tiene lugar en la glándula mamaria (164).

A pesar que los estudios histológicos realizados en el modelo murino de infección *Ima* descrita en este trabajo avalan su utilización para el rastreo inmunológico de cepas vacunas prototípicas, no puede desconocerse que la infección natural en bovinos y la infección experimental en ratones podrían presentar ciertas diferencias. Sin embargo, este modelo resultó de gran utilidad para estudiar la capacidad de una CVA prototípica de *S. aureus* de inducir inmunidad protectora en la glándula mamaria. Asimismo, este modelo permitió describir las respuestas inmunológicas que es menester inducir en la glándula mamaria para lograr la erradicación de *S. aureus* en un huésped vacunado. La evaluación inmunológica definitiva de la CVA a ser utilizada como vacuna deberá realizarse en rumiantes.

Los linfocitos de la glándula mamaria son capaces de producir

inmunoglobulinas como resultado de la estimulación antigénica local. La inmunoglobulina producida por estas células es a menudo de tipo IgA, un concepto que también aplica a los rumiantes. En estudios realizados con diferentes antígenos, se demostró que la máxima estimulación de la inmunidad de la glándula mamaria de los rumiantes pudo lograrse cuando el inmunógeno fue introducido en forma local durante la etapa de no lactancia o período seco (2 últimos meses de la preñez en bovinos) (121). En el presente trabajo se demostró que la inmunización *Ima* de ratones con la CVA A523 durante la primera semana de la lactancia inducía una disminución significativa en el número de UFC remanentes en la glándula mamaria luego del desafío con la cepa virulenta parental. Este esquema de inmunización, sin embargo, no sería aceptable para vacunar rumiantes destinados a la lechería una vez que ya se encuentran en régimen de producción. En este trabajo, se demostró asimismo, que la protección de la glándula mamaria frente al desafío experimental con *S. aureus* también se obtuvo cuando los ratones se inmunizaron por la ruta *Ima* durante la última semana de la preñez. La relevancia de este hallazgo radica en que la inmunización resultó efectiva cuando se administró en un período que correspondería aproximadamente al período seco de los bovinos.

La inmunización realizada durante la semana anterior al inicio de la preñez (esquema de inmunización I) no otorgó protección de la glándula mamaria. La falta de protección no puede atribuirse a alteraciones en la permanencia de la CVA A523 en la glándula mamaria, ya que la permanencia de esta cepa fue equivalente a la observada cuando se la administró en períodos que resultaron protectores (esquema de inmunización III y IV). La falta de protección podría deberse al escaso desarrollo del epitelio de la glándula mamaria característico de ratones hembra aún no preñados, dado que se ha descrito que la aparición de linfocitos en dicha mucosa se asocia al estado de preñez o lactancia (180). Asimismo, la falta de protección observada al utilizar el esquema I podría haberse debido al prolongado período transcurrido entre la inmunización y el desafío. La inmunización durante la etapa temprana de la preñez (de acuerdo al esquema de inmunización II) resultó en la presencia de bacterias revertantes al fenotipo parental en la glándula mamaria. La razón verdadera de este hecho no pudo ser

demostrada pero existen factores que podrían haber contribuido a la aparición y permanencia de bacterias revertantes. La CVA A523 es una cepa prototípica útil para estudiar los mecanismos inmunes de la glándula mamaria, pero su fenotipo puede presentar una cierta reversión *in vivo*. En este sentido, cualquier mínima alteración en los mecanismos de defensa del huésped puede hacer que éste sea incapaz de controlar el desarrollo de unas muy pocas bacterias revertantes en la presencia de grandes cantidades de bacterias con fenotipo *ts*. Esta condición puede ser la de los animales involucrados en este estudio durante un período corto de la preñez, ya que los cambios en los niveles hormonales (incluyendo hormonas sexuales) que se observan en esta etapa se encuentran generalmente ligados a cambios en los patrones de secreción de citoquinas y a una concomitante depresión de la respuesta inmune (88, 141). Inesperadamente, la utilización de una CVA prototípica que no es completamente estable permitió establecer que la inmunización durante la etapa temprana de la preñez no resultaría efectiva dada la inmunosupresión que existe durante este período. El problema de la inestabilidad genética de cepas con una única mutación *ts* puede ser superado, por ejemplo, mediante la combinación en una cepa de dos o más mutaciones de idéntico fenotipo, produciendo de esta manera, una reducción de la frecuencia de reversión hasta niveles no significativos (10^{-21}). La factibilidad de la construcción de estos mutantes ha sido demostrada para *Haemophilus influenzae* (66) y *Salmonella typhi* (67). Asimismo, cabe señalar que la validez de los resultados obtenidos en el presente trabajo con una CVA por termosensibilidad no depende necesariamente del fenotipo de bacteria viva atenuada utilizado. Otras CVA que conserven los determinantes antigénicos intactos y sean capaces de expresarlos *in vivo* podrían ser utilizadas con resultados favorables dado que el éxito de la estrategia inmunoproláctica propuesta depende principalmente de la utilización de una CVA y no de su fenotipo.

La administración de la mayoría de las vacunas propuestas para la prevención de la mastitis estafilocócica se ha realizado por la ruta parenteral, a pesar del conocimiento de que la inmunización sistémica es esencialmente inefectiva para la inducción de respuestas inmunes en las mucosas (21, 99, 146, 171, 184).

En este sentido, al considerar la falta de éxito de los intentos de vacunación para prevenir las infecciones *Ima* por *S. aureus* realizados hasta el presente, es importante destacar que en la mayoría de los estudios se ha puesto gran énfasis en lograr un aumento de los niveles de IgG circulantes con el fin de proveer opsoninas locales durante el desarrollo de la infección (184). Sin embargo, dado que el pasaje de anticuerpos de la circulación a la glándula mamaria requiere el desarrollo de un fenómeno inflamatorio local, es necesario considerar que *S. aureus* no induce una respuesta inflamatoria importante al diseminarse sobre la mucosa mamaria y por el contrario, se ha descrito la producción *in vitro* por esta bacteria de factores inhibitorios de la quimiotaxis (137, 139, 172). De esta manera, al ingresar *S. aureus* a la glándula mamaria de un huésped vacunado por la ruta sistémica encontraría muy pocos impedimentos para crecer en ausencia de anticuerpos específicos. Los anticuerpos circulantes inducidos por la inmunización parenteral sólo podrían llegar al sitio de la infección luego que la bacteria ha colonizado el epitelio e iniciado el daño del tejido necesario para generar una respuesta inflamatoria considerable. La presencia en tal momento de anticuerpos dirigidos contra adhesinas de *S. aureus* no resultaría efectiva para prevenir la colonización y los anticuerpos específicos contra las citotoxinas podrían disminuir parte del daño de los tejidos, pero no evitarían la instalación de la nueva infección. Detrás de una estrategia más moderna, se ha demostrado que la inoculación local *Ima* de antígenos particulados (bacterias completas) fue más eficiente que la inmunización sistémica para inducir la producción de anticuerpos en leche (87, 111). En el presente trabajo, se demostró que la protección de la glándula mamaria murina contra la infección experimental por *S. aureus* pudo lograrse por inmunización local *Ima* con la CVA A523. Estos resultados concordaron con los obtenidos por Finch *et al.*, quienes demostraron la eficacia de la inmunización local en bovinos contra el desafío experimental *Ima* por *Streptococcus uberis*. Asimismo, en ese trabajo se demostró que la protección inducida por la inmunización *Ima* se correlacionó con la presencia de anticuerpos de tipo IgM específicos contra *S. uberis* en leche (43). En el presente trabajo, la reducción significativa en el número de UFC de *S. aureus* luego del desafío experimental observada en ratones inmunizados por la ruta *Ima* se correlacionó con la presencia de elevados niveles de IgA e IgG específica contra *S. aureus* en leche pero no con los niveles de IgG específica en plasma. Asimismo, en este trabajo se

demostró la presencia de linfocitos B activados en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de los ratones inmunizados por la ruta *Ima*. La inmunización *ip* con dosis de la CVA A523 equivalentes a las utilizadas en la inmunización *Ima* (esquema de inmunización V) no indujo la presencia de anticuerpos en leche y se observó un aumento significativo pero moderado en los niveles de IgG en plasma. La utilización de un mayor número de inoculaciones por la ruta *ip* con una dosis considerablemente mayor de la CVA A523 (10^8 UFC vs. 5×10^6 UFC; esquema de inmunización VI) indujo la presencia de niveles significativamente mayores de IgG en plasma y en leche de los ratones inmunizados. Sin embargo, estos ratones no resultaron protegidos contra la infección *Ima* experimental por *S. aureus* a pesar de los elevados niveles de anticuerpos circulantes. En estudios previos de nuestro laboratorio, utilizando CVA por termosensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa*, se demostró que la inmunización local con la CVA inducía protección en las vías respiratorias bajas. De manera similar a lo observado en la glándula mamaria, la protección de la mucosa respiratoria se correlacionó con la presencia de elevados niveles de IgA específica en pulmón pero no se correlacionó con la presencia de IgG plasmática (46, 152).

Las citotoxinas secretadas por *S. aureus* son responsables de gran parte del daño tisular producido por esta bacteria (18, 29). En este trabajo se demostró que la CVA A523 producía, al ser cultivada *in vitro* a la temperatura restrictiva, los mismos exoproductos que la cepa virulenta parental. De esta manera, durante el período en que esta cepa es capaz de replicar en la glándula mamaria podría producir las citotoxinas involucradas en la infección natural. Dado que la mayoría de las cepas aisladas de leche de bovinos con mastitis producen hemolisina α y β (2, 7), uno de los objetivos a alcanzar mediante la vacunación es la inducción de la producción de anticuerpos específicos que puedan neutralizar estas hemolisinas y evitar el daño producido por las mismas. En este trabajo se demostró que la inmunización *Ima* con la CVA A523 inducía la presencia de elevados niveles de anticuerpos anti-hemolisina α en la leche y el plasma de los ratones inmunizados. Estos resultados demostraron que la CVA A523 es capaz de expresar esta citotoxina *in vivo* e inducir la producción de anticuerpos neutralizantes indispensables para prevenir el daño tisular durante la infección

estafilocócica. La sola presencia de anticuerpos anti-hemolisina α no se correlacionó con una mayor depuración de *S. aureus* de la glándula mamaria. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en los que se demostró que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-hemolisina α reducía la mortalidad de ratones inoculados por la ruta sistémica con *S. aureus* pero no prevenía la infección (103).

En este trabajo se evaluó además, la presencia de anticuerpos anti-ácidos lipoteicoicos, un componente esencial de la pared de *S. aureus*. Poco se conoce acerca del rol de los anticuerpos anti-ácidos lipoteicoicos en las infecciones por *S. aureus*. La presencia de estos anticuerpos en la leche de los ratones inmunizados mediante esquemas que no resultaron protectores (esquema I) y su ausencia en la leche de los ratones inmunizados mediante esquemas protectores (esquema IV) permite sugerir que estos anticuerpos no jugarían un rol relevante en la prevención de las infecciones *Ima* por *S. aureus*.

Asimismo, cabe señalar que la correlación entre la protección de la glándula mamaria y la presencia de IgA e IgG específicas en leche observada en este trabajo, no significa que estos anticuerpos sean los únicos efectores de la protección dado que las defensas antibacterianas en la glándula mamaria son multifactoriales y otros mecanismos pueden ser responsables del aumento de la depuración de *S. aureus* luego del desafío experimental. Más aún, en contraste con muchos otros patógenos, la presencia de anticuerpos contra *S. aureus* no parece proteger completamente al huésped de la colonización o la infección (41, 44), por lo que el rol de otros componentes del sistema inmune en la protección de la glándula mamaria debe ser considerado.

Estudios recientes demostraron que *S. aureus* puede ser internalizado por fagocitos profesionales y no profesionales y sobrevivir en el medio intracelular. A la luz de estos hallazgos, se propuso que la sobrevivencia de *S. aureus* en el medio intracelular jugaría un rol fundamental en la patogénesis de la mastitis bovina (17, 37, 41, 91). Es sorprendente que a pesar que el incremento en la incidencia de la mastitis se ha asociado tradicionalmente a una actividad

disminuida de fagocitos y linfocitos de la glándula mamaria, (80, 148, 160), la contribución que las vacunas potenciales actualmente disponibles podrían ejercer sobre la estimulación de respuestas adaptativas mediadas por células en la glándula mamaria no ha sido establecida. La hipótesis de este trabajo de investigación propone, entre otras cosas, que el diseño racional de una vacuna para la prevención de las infecciones *Ima* estafilocócicas requiere un conocimiento más profundo sobre la regulación por LT de la respuesta inmune de la glándula mamaria, tendiente a la erradicación de *S. aureus* en su forma intracelular. En este estudio se demostró que la inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo inmunidad mediada por células en la glándula mamaria en un modelo murino. La relevancia que este hallazgo puede tener en la protección de la glándula mamaria bovina frente a la infección estafilocócica merece discusión desde diferentes puntos de vista a la luz de la información disponible.

La capacidad diferencial de los patógenos de interactuar con componentes celulares de la inmunidad innata tales como macrófagos, células NK o LT con receptor $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) puede influenciar el balance global de citoquinas presentes durante los primeros estadios de la respuesta inmune y determinar si la inmunidad adaptativa será desviada hacia respuestas de tipo humorales o celulares (72). Evidencias recientes demostraron que los superantígenos producidos por *S. aureus* podrían desviar una potencial respuesta inmune protectora hacia una respuesta no competente para erradicar patógenos intracelulares (41). Además, en estudios donde se estudiaron las secreciones lácteas de la glándula mamaria de bovinos infectados con *S. aureus* se demostró la presencia de una subpoblación de LT CD8⁺ activados capaces de alterar o suprimir las respuestas proliferativas de los LT CD4⁺ (160). En un estudio reciente se describió la presencia de ARNm de IL-10 en un alto porcentaje de muestras de leche de bovinos infectados con *S. aureus* y una escasa detección de ARNm de IFN- γ (139). La capacidad de *S. aureus* de inducir la producción prematura de citoquinas de tipo Th2 en conjunción con la invasión de células epiteliales y una endocitosis no estimuladora en los macrófagos puede permitir la supervivencia intracelular de *S. aureus* en un huésped inmunocompetente (41). En consecuencia, la erradicación de *S. aureus* en su forma intracelular sólo

podría lograrse si una apropiada respuesta de tipo Th1 es desarrollada en el sitio de la infección.

Se demostró que el tratamiento con IFN- γ revertía el efecto supresor de las secreciones de la glándula mamaria *in vitro* e incrementaba la capacidad funcional de las células fagocíticas de la glándula mamaria contra *S. aureus*. Más aún, la administración *Ima* de IFN- γ recombinante fue efectiva en la exacerbación de la actividad fagocítica y bactericida de los neutrófilos de la glándula mamaria *in vivo* (160). En el presente trabajo, mediante la detección de citoquinas a nivel de células individuales por citometría de flujo, se demostró la capacidad de los LT CD4+ de ratones inmunizados con la CVA A523 de producir IFN- γ luego de la estimulación *in vitro* con antígenos de *S. aureus*. Más aún, los LT CD4+ provenientes de ratones inmunizados fueron capaces de producir IFN- γ en respuesta al desafío experimental con la cepa virulenta parental de *S. aureus*. Riollot *et al.* recientemente postularon que el ARNm de IL-10 detectado en muestras de leche de vacas con mastitis podría estar producido por LT CD8+ de fenotipo supresor, dado que se ha descripto la presencia de este tipo de células durante las infecciones *Ima* por *S. aureus* (125, 139). Un hallazgo importante del presente trabajo es que durante la infección experimental por *S. aureus* no sólo los LT CD4+ sino que también los LT CD8+ provenientes de ratones inmunizados por la ruta *Ima* produjeron IFN- γ . En este sentido, se ha demostrado que el control de la infección por otro patógeno intracelular como *M. tuberculosis* requiere la presencia de LT CD8+ capaces de producir IFN- γ , lo cual sugiere que dichas células podrían ejercer su función a través de la activación de macrófagos y no sólo por un mecanismo de citotoxicidad (162). El rol protectorio de la producción de IFN- γ por LT CD8+ también se demostró en infecciones virales, en las cuales la citotoxicidad ha sido previamente propuesta como el principal mecanismo antiviral ejercido por estas células (59).

Además de los LT CD4+ y CD8+, los LT $\gamma\delta$, y las células NK pueden participar en el control de las infecciones causadas por ciertas bacterias intracelulares (15, 104, 109, 120). Recientemente, diversos investigadores han hecho énfasis en el rol potencial de los LT $\gamma\delta$ en la defensa de la glándula

mamaria de bovinos contra bacterias que causan mastitis. Esta hipótesis se basa en observaciones indirectas tales como la significativa disminución en el porcentaje de LT $\gamma\delta$ en el parénquima mamario durante el período post-parto, momento en que la susceptibilidad para las infecciones *Ima* es mayor (80, 147, 148, 160). Sin embargo, en un estudio reciente donde se evaluaron los cambios en las poblaciones celulares de la glándula mamaria durante la infección por *S. aureus*, no se hallaron diferencias en el porcentaje de LT $\gamma\delta$ entre animales infectados y sanos (139). En el modelo murino utilizado en el presente trabajo, no se observó expansión diferencial de los LT $\gamma\delta$ provenientes de los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria de ratones inmunizados ni control durante la estimulación secundaria *in vitro* o durante la infección experimental con *S. aureus*. Estos resultados concuerdan con lo observado por Riollet *et al.*, quienes demostraron la ausencia de participación de los LT $\gamma\delta$ durante las respuestas tempranas de la glándula mamaria en bovinos previamente inmunizados con hemolisina α (138). Los resultados obtenidos en el presente trabajo y las evidencias experimentales disponibles hasta el momento (138, 139) sugieren que si los LT $\gamma\delta$ juegan algún rol durante la respuesta inmune temprana contra *S. aureus* podría ser en la localización intraepitelial.

Yoshihara *et al.* demostraron la producción de IFN- γ por células NK y no por LT, al estimular células mononucleares humanas de sangre periférica vírgenes *in vitro* con *S. aureus* (188). En este sentido, una población de células linfoideas con actividad simil-NK se ha aislado de la glándula mamaria de bovinos (160). En el modelo murino utilizado en el presente trabajo, no se observó producción de IFN- γ por células NK de ratones inmunizados ni control luego de la estimulación con *S. aureus*. Este resultado sugiere que las células NK no estarían principalmente involucradas durante las respuestas tempranas frente a *S. aureus* en la glándula mamaria. Estudios futuros en bovinos serán necesarios para dilucidar el verdadero rol de las células NK en la protección contra las infecciones *Ima* por *S. aureus*.

En síntesis, en el presente estudio se demostró que la inmunización local con una CVA de *S. aureus* indujo una respuesta inmune mediada por células en

la glándula mamaria. A partir de los resultados obtenidos, se demostró que la inmunización *Ima* indujo la sensibilización de poblaciones de linfocitos capaces de responder frente a antígenos estafilocócicos durante la estimulación *in vitro* así como durante la infección experimental *in vivo*. Los LT CD4+ y CD8+ serían las principales poblaciones linfocitarias involucradas durante la respuesta inmune celular desarrollada en respuesta a la infección experimental por *S. aureus*. Ambos tipos de LT fueron capaces de producir IFN- γ , una citoquina que puede jugar un rol fundamental en la erradicación de *S. aureus* intracelular. La relevancia de estos hallazgos radica en que la vacuna prototípica propuesta y el esquema y ruta de inmunización elegidos, inducen una respuesta inmune adaptativa apropiada para la erradicación de patógenos intracelulares, dentro de los cuales en la actualidad se lo considera a *S. aureus*. De esta manera se pudo demostrar que la inmunización con la CVA A523 genera efectores de la respuesta inmune celular que podrían prevenir la persistencia de *S. aureus* y por consiguiente la infección *Ima* crónica.

5. Conclusiones

5.1. CONCLUSIONES PARCIALES

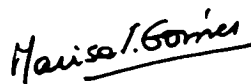
1. Se obtuvo una cepa termosensible de *S. aureus* (A523) con fenotipo de replicación limitada que demostró poseer una frecuencia de reversión *in vitro* lo suficientemente baja como para permitir su utilización en experimentos controlados en animales pequeños de laboratorio.
2. El perfil de exoproductos secretados por la cepa termosensible A523 durante el cultivo *in vitro* coincidió con el de la cepa virulenta parental.
3. La cepa termosensible A523 resultó atenuada en un modelo murino de infección sistémica, lo cual permitió su utilización como cepa viva atenuada prototípica de *S. aureus* (CVA A523).
4. La CVA A523 resultó inmunógena y otorgó protección frente al desafío con la cepa virulenta parental al ser administrada por la ruta intraperitoneal (*ip*).
5. Se desarrolló un modelo de infección intramamaria (*Ima*) por *S. aureus* 8325-4 ϕ 11. Las lesiones histológicas observadas concordaron con las descritas durante la mastitis bovina. La utilización de este modelo permitió caracterizar las respuestas inmunes que es necesario inducir en la glándula mamaria para otorgar protección frente a las infecciones estafilocócicas.
6. La CVA A523 permaneció durante 4 días en la glándula mamaria al ser inoculada por la ruta local *Ima*. La permanencia transitoria de la CVA A523 en la glándula mamaria no indujo una respuesta inflamatoria ni afectó la funcionalidad del epitelio secretorio.
7. La inmunización por la ruta local *Ima* con la CVA A523 indujo protección frente a la infección experimental por la cepa virulenta parental, evaluada como una mayor velocidad de depuración del inóculo patógeno de la glándula mamaria.

8. Se determinó que la última semana de la preñez o la primera semana de la lactancia son los periodos apropiados para inducir inmunidad protectora en la glándula mamaria mediante la inmunización local. No obstante, la inmunización durante la última semana de la preñez sería el esquema más apropiado para su utilización en rumiantes destinados a la lechería.
9. La inmunización por la ruta *Ima* con la CVA A523 indujo un aumento en el porcentaje relativo de linfocitos B y T activados en los ganglios linfáticos drenantes de la glándula mamaria.
10. La protección de la glándula mamaria otorgada por la inmunización local con la CVA A523 se correlacionó con la presencia de elevados niveles de IgA e IgG anti-*S. aureus* en la leche de los ratones inmunizados.
11. La inmunización por la ruta sistémica *ip* con la CVA A523 indujo altos niveles de IgG en circulación, acompañados de altos niveles de IgG anti-*S. aureus* en leche. Sin embargo, la inmunización por esta ruta no otorgó protección frente al desafío *Ima*. Estos hallazgos corroboraron la hipótesis que los anticuerpos inducidos mediante inmunización sistémica son ineficaces para la prevención de las infecciones *Ima*.
12. La inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo la producción de anticuerpos anti-hemolisina α en la glándula mamaria, cuya presencia podría prevenir el daño tisular durante las infecciones estafilocócicas. Este hallazgo permitió demostrar, indirectamente, la producción *in vivo* de hemolisina α por parte de la CVA A523 durante su permanencia transitoria en la glándula mamaria.
13. La inmunización *Ima* con la CVA A523 indujo la sensibilización de linfocitos de la glándula mamaria capaces de responder frente al estímulo *in vitro* o durante la infección *in vivo* por *S. aureus*.
14. La inmunización *Ima* indujo la producción de IFN- γ por linfocitos T CD4+ al ser estimulados *in vitro* con antígenos de *S. aureus*.

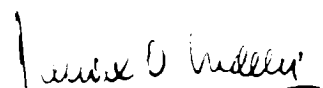
15. La inmunización *Ima* indujo la producción de IFN- γ durante la infección experimental por *S. aureus*. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ fueron las principales poblaciones involucradas en la producción de dicha citoquina.

5.2. CONCLUSION GENERAL

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron demostrar que la inmunización local *Ima* con una cepa viva atenuada durante la etapa final de la preñez es un método adecuado para inducir inmunidad protectora en la glándula mamaria. El diseño racional de una vacuna para la prevención de las infecciones *Ima* por *S. aureus* requiere la inducción de anticuerpos que prevengan la colonización, neutralicen las citotoxinas involucradas en el daño al epitelio y aumenten la opsonofagocitosis, así como también una respuesta inmune mediada por células que permita erradicar las bacterias que alcancen el medio intracelular. En este trabajo se demostró que la inmunización local *Ima* con la CVA A523 indujo la presencia de los mediadores de la respuesta inmune necesarios para prevenir las infecciones *Ima* por *S. aureus*. La presencia de IgG e IgA específicas contra *S. aureus* en la glándula mamaria podría prevenir la colonización y contribuir a la opsonización. Asimismo, la presencia de anticuerpos contra citotoxinas como la hemolisina α jugaría un rol fundamental en la prevención del daño al epitelio secretor. Más aún, la presencia en forma conjunta de dichos anticuerpos y de linfocitos capaces de producir citoquinas de tipo Th1 inducidos por la inmunización local constituye una estrategia promisorio para prevenir el establecimiento de la infección *Ima* crónica por *S. aureus* en un huésped vacunado. Se requerirán futuros ensayos controlados de inmunización en bovinos con CVA de fenotipo estable para extender la validez de nuestros hallazgos a rumiantes destinados a la lechería.



Lic. Marisa Inés Gómez



Dr. Daniel O. Sordelli

Director de Tesis



Dra. Verónica E. García

Directora Asistente

6. Referencias Bibliográficas

1. Aarestrup F.M., Scott N.L., Sordillo L.M. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. *Infect. Immun.* 62:5679-5682, 1994.
2. Aarestrup F.M., Larsen H.D., Eriksen N.H.R., Elsberg C.S., Jensen N.E. Frequency of alpha-and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. *APMIS* 107:425-430, 1999.
3. Abraham S.N., Beachey E.H. Host defenses against adhesion of bacteria to mucosal surfaces. *Adv. Host Def. Mech.* 4:63, 1985.
4. Abraham S.N., Sharon N., Ofek I. Adhesion of bacteria to mucosal surfaces, pp.31-42. En: *Mucosal Immunology*. Ogra P., Lamm M.E., Bienestock J., Mestecky J., Strober W., McGhee J.R. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, 1999.
5. Ada G.L. Modern Vaccines. The immunological principles of vaccination. *Lancet* 335:523-526, 1990.
6. Ahmed S., Meghji S., Williams R.J., Henderson B., Brock J.H., Nair S.P. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69:2872-2877, 2001.
7. Ali-Vehmas T., Vikerpuur M., Pyorala S., Atroshi F. Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiol. Res.* 155:339-344, 2001.
8. Almast. Asociación Argentina de Lucha contra la Mastitis. Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina. *Comm. Fed. Lechería Arch. Lechería* 6:73, 1983.
9. Anderson J.C. Experimental staphylococcal mastitis in the mouse: The induction of chronic mastitis and its response to antibiotic therapy. *J. Comp. Path.* 87:611-621, 1977.
10. Anderson J.C. Progressive pathology of staphylococcal mastitis with a note on control, immunization and therapy. *Vet. Rec.* 110:372-376, 1982.
11. Anderson J.C., Adlam C., Knights J.M. The effect of staphylocoagulase in the mammary gland of the mouse. *Br. J. Exp. Pathol.* 63:336-340, 1982.
12. Anderson J.C. Veterinary aspects of staphylococci, pp. 193-241. En: *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 1: Clinical and epidemiological aspects. Easmon C.S.F., Adlam C. (ed.). Academic Press, London, 1983.

13. Arvidson S.O. Extracellular enzymes of *Staphylococcus aureus*, pp.745-808. En: *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol 2: The organism *in vivo* and *in vitro*. Easmon C.S.F., Adlam C. (ed.). Academic Press, London, 1983.
14. Baddour L.M., Lowrance C., Albus A., Lowrance J.H., Anderson S.K., Lee J.C. *Staphylococcus aureus* microcapsule expression attenuates bacterial virulence in a rat model of experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.* 165:749-753, 1992.
15. Bancroft G.J., Schreiber R.D., Unanue E.R. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* 124:5-24, 1991.
16. Bastida-Corcuera K.F. The enhancement of mammary gland immunity through vaccination, p. 335. En *Bovine Medicine: Diseases and husbandry of cattle*. Andrews A.H., Blowey R.W., Boyd H., Eddy R.C. (ed.). Blackwell Sci. Publ., Cambridge, MA, 1992.
17. Bayles K.W., Wesson C.A., Liou L.E., Fox L.K., Bohach G.A., Trumble W.R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66:336-342, 1998.
18. Bohach G.A., Foster T.J. *Staphylococcus aureus* exotoxins, pp. 367-378. En: *Gram-positive pathogens*. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. (ed.). ASM Press, Washington, DC, 2000.
19. Bramley A.J., King J.S., Higgs T.M., Neave F.K. Colonization of the bovine teat duct following inoculation with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Br. Vet. J.* 135:149-162, 1979.
20. Bramley A.J., Dodd F.K. Reviews of the progress in dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J. Dairy Res.* 51:481-512, 1984.
21. Brandtzaeg P., Farstad I.N., Haraldsen G. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* 20:267-277, 1999.
22. Butler J.E. Immunoglobulins and Immunocytes in animal milks, pp. 1531-1554. En: *Mucosal Immunology*. Ogra P., Lamm M.E., Bienestock J., Mestecky J., Strober W., McGhee J.R. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, 1999.
23. 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., Nagel R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 80:854-858, 1997.

24. Capuco A.V., Bright S.A., Pankey J.W., Wood D.L., Miller R.H., Bitman J. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 75:2126-2130, 1992.
25. Carlsson A., Bjorck L., Persson K. Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *J. Dairy Sci.* 72:3166-3175, 1989.
26. Cerquetti M.C., Gherardi M.M., Sordelli D.O. Evaluation of different temperature-sensitive mutant phenotypes of *Salmonella enteritidis* as vaccine potentials. *Curr. Microbiol.* 21:225-228, 1990.
27. Chandler R.L. Experimental bacterial mastitis in the mouse. *J. Med. Microbiol.* 3:273-282, 1970.
28. Chandran R.C., Shahani K.M., Holly K.G. Lysozyme content of human milk. *Nature (Lond.)* 204:688, 1964.
29. Cifrian E., Guidry A.J., Marquart W.W. Role of milk fractions, serum and divalent cations in protection of mammary epithelial cells of cows against damage by *Staphylococcus aureus* toxins. *Am. J. Vet. Res.* 57:308-312, 1996.
30. Colditz I.G., Maas P.J. The inflammatory activity of activated complement in ovine and bovine mammary glands. *Immunol. Cell. Biol.* 65(Pt6):433-436, 1987.
31. Corbellini C.N. Actualización en la patogenia y diagnóstico de las mastitis. En: *Memorias del Congreso Nacional de Calidad de leche y Mastitis*, pp.37-48. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, 1996.
32. Daley M.J., Williams T., Dougherty R., Coyle P., Furda G., Hayes P. *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 and interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74:4413-4424, 1991.
33. De Libero G. Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Today.* 18:22-26, 1997.
34. Detilleux J.C., Kehrli M.E. Jr., Stabel J.R., Freeman A.E., Kelley D.H. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44:251-267, 1995.
35. Diker K.S., Hazirolu R., Diker F.S. Experimental infection of the mouse mammary gland with *Campylobacter coli*. *Res. Vet. Sci.* 52:123-125, 1992.
36. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:16-34, 2000.

37. Dziewanowska K., Patti J.M., Deobald C.F., Bayles K.W., Trumble W.R., Bohach G.A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* 67:4673-4678, 1999.
38. Dobrzanski M.J., Yang T.J. Phenotypic and functional analysis of mucosal lymph node T cell subpopulations proximal and distal to chronic staphylococcal antigen challenge. *Immunol. Investig.* 21:123-142, 1992.
39. Falcow S. Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* 65:1099-1102, 1991.
40. Ferens W.A., Goff W.L., Davis W.C., Fox L.K., Deobald C., Hamilton M.J., Bohach G.A. Induction of type 2 cytokines by a staphylococcal enterotoxin superantigen. *J. Nat. Toxins* 7:193-213, 1998.
41. Ferens W.A., Bohach G.A. Persistence of *Staphylococcus aureus* on mucosal membranes: Superantigens and internalization by host cells. *J. Lab. Clin. Med.* 135:225-230, 2000.
42. Ferrick D.A., Schrenzel M.D., Mulvania T., Hsieh B., Ferlin W.G., Lepper H. Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo. *Nature* 373:255-257, 1995.
43. Finch J.M., Hill A.W., Field T.R., Leigh J.A. Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. *Infect. Immun.* 62:3599-3603, 1994.
44. Foster T.J. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 9:221-227, 1991.
45. Fox L.K., Liggitt H.D., Yilma T., Corbeil L.B. The effects of interferon intramammary administration on mammary phagocyte function. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 37:28-30, 1990.
46. García V.E., Sordelli D.O., Gherardi M.M., Morris-Hooke A. Humoral immunity induced in the lower respiratory tract by local immunization with temperature-sensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* 22:265-269, 1991.
47. García V. E., Gherardi M.M., Iglesias M.F., Cerquetti M.C., Sordelli D.O. Local and systemic immunity against *Streptococcus pneumoniae*: humoral responses against a non-capsulated temperature-sensitive mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 108:163-168, 1993.

48. García V.E., Gherardi M.M., Gómez M.I., Cerquetti M.C., Sordelli D.O. The effect of intragastric immunization followed by intranasal boosting with live-attenuated bacteria on pulmonary defenses against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine Res.* 4:11-17, 1995.
49. García V.E., Uyemura K., Sieling P.A., Ochoa M.T., Morita C.T., Okamura H., Kurimoto M., Rea T.H., Modlin R.L. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J. Immunol.* 162:6114-6121, 1999.
50. Garcia-Penarrubia P., Koster F.T., Kelley R.O., McDowell T.D., Bankhurst A.D. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 169:99-113, 1989.
51. Germanier R. *Bacterial Vaccines*. Germanier R. (ed.). Academic Press Inc., NY, 1984.
52. Gershwin L.J., Krakowka S., Olsen R.G. Immunoglobulins, p. 34. En: *Immunology and Immunopathology of domestic animals*. Miller A. (ed.). Mosby Press, St. Louis, MO, 1995.
53. Gherardi M.M., Gómez M.I., García V.E., Sordelli D.O., Cerquetti M.C. *Salmonella enteritidis* temperature-sensitive mutants protect mice against challenge with virulent *Salmonella* strains of different serotypes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29:81-88, 2000.
54. Gilbert F.B., Poutrel B., Sutra L. Immunogenicity in cows of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide-ovoalbumin conjugate. *Vaccine* 12: 369-374, 1994.
55. Gilbert R.O., Grohn Y.T., Miller P.M., Hoffman D.J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36:75-82, 1993.
56. Giraudo J.A., Calzolari A., Rampone H., Rampone A., Giraudo A.T., Bogno C., Larriestra A., Nagel R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J. Dairy Sci.* 80:845-853, 1997.
57. Gresham H.D., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L., Lindberg F.P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* 164:3713-3722, 2000.
58. Gudding C., McDonald J.S., Cheville N.F. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *A. J. Vet. Res.* 45:2525-2531, 1984.
59. Guidotti L.G., Chisari F.V. To kill or to cure: options in host defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 8:478-483, 1996.

60. Guidry A.J., Paape M.J., Pearson R.E. Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *Am. J. Vet. Res.* 37:1195-1200, 1976.
61. Guidry A., Fattom A., Patel A., O'Brien C., Shepherd S., Lohuis J. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 59:1537-1539, 1998.
62. Hebert A., Sayasith K., Senechal S., Dubreuil P., Lagace J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 193:57-62, 2000.
63. Herbelin C., Poutrel B., Gilbert F.B., Rainard P. Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with staphylococcal α -toxin. *J. Dairy Sci.* 80:2025-2034, 1997.
64. Heufler C., Koch F., Stanzl U., Topar G., Wysocka M., Trinchieri G., Enk A., Steinman R.M., Romani N., Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* 26:659-668, 1996.
65. Holderbaum D., Hall G.S., Ehrhart L.A. Collagen binding to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 54:359-364, 1986.
66. Hooke A.M., Bellanti J.A., Oeschger M.P. Live attenuated bacterial vaccines: new approaches for safety and efficacy. *Lancet* 29;1:1472-1474, 1985.
67. Hooke A.M., Cerquetti M.C., Zeligs B.J., Wang Z., Hoberg K., Bellanti J.A. Genetically stable temperature-sensitive mutants of *Salmonella typhi* induce protection in mice. *Vaccine* 11:1386-1389, 1993.
68. Howard C.J., Taylor G., Brownlie J. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res. Vet. Sci.* 29:128-130, 1980.
69. Hudson M., Ramp N., Nicholson A., Williams A., Nousisinen M. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb. Pathog.* 19:409-419, 1995.
70. Inoue T., Yoshikai Y., Matsuzaki G., Nomoto K. Early appearing $\gamma\delta$ -bearing T cells during infection with calmette guerin bacillus. *J. Immunol.* 146:2754-2762, 1991.
71. Ishikawa H. Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Nippon Juigaku Zasshi* 49:469-475, 1987.

72. Janeway, C.A., Jr., Travers P. Host defense against infection, p. 9.1-9.46. En: Immunobiology: the immune system in health and disease. Robertson M., Lawrence E. (ed.). Current Biology Ltd, London, Garland Publishing Inc., NY, 1996.
73. Jonsson P., Lindberg M., Haraldsson I., Wadstrom T. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. Infect. Immun. 49:765-769, 1985.
74. Kashiwazaki Y., Maede Y., Namioka S. Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. Nippon Juigaku Zasshi 47:337-339, 1985.
75. Kehrli M.E. Jr., Nonnecke B.J., Roth J.A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. Am. J. Vet. Res. 50:207-214, 1989.
76. Kehrli M.E. Jr., Nonnecke B.J., Roth J.A. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. Am. J. Vet. Res. 50:215-220, 1989.
77. Kehrli M.E., Goff J.P., Stevens M.G., Boone T.C. Effects of granulocyte colony stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding. J. Dairy Sci. 74:2448-2458, 1991.
78. Kenny K., Reiser R.F., Bastida-Corcuera F.D., Norcross N.L. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31:706-707, 1993.
79. Kerlin R.L., Watson D.L. The secondary immune response to *Staphylococcus aureus* vaccines in efferent popliteal lymph of sheep. J. Immunol. 60:295-301, 1987.
80. Kimura K., Goff J.P., Kehrli M.E. Jr., Harp J.A. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. J. Dairy Sci. 82:315-319, 1999.
81. Kinsman O., Jonsson P., Haraldsson I., Lindberg M., Arbuthnott J.P., Wadstrom T. Decreased virulence of alpha haemolysin negative and coagulase negative mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental mastitis in mice. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Suppl 10:651-659, 1981.
82. Kiyono H., Fujihashi K., Yamamoto M., Hiroi T., Coste M., Kawabata S., Boyaca P., McGhee J.R. Intraepithelial $\gamma\delta$ T cell and epithelial cell interactions in the mucosal immune system, pp. 195-204. En: Essentials of mucosal immunology. Kagnoff M.F., Kiyono H. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, 1996.

83. Kloos W.E., Schleifer K.H. *Staphylococcus*, pp. 1013-1035. En: Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol 2. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holy J.G. (ed.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1986.
84. Kubac B.M., Yotis W.W. Solubilization and electrophoretic analysis of *Staphylococcus aureus* membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 687:238-246, 1982.
85. Kuusela P. Fibronectin binds to *Staphylococcus aureus*. Nature 276:718-720, 1978.
86. Lai W.C., Bennett M., Lu Y.S., Pakes S.P. Biological evaluation of *Mycoplasma pulmonis* temperature-sensitive mutants for use as possible rodent vaccines. Infect. Immun. 58:2289-2296, 1990.
87. Lascelles A.K., Beh K.J., Mukkur T.K., Watson D.L. The mucosal immune system with particular reference to ruminant animals, pp. 429-457. En: The ruminant immune system in health and disease. Morrison W.I. (ed.). Cambridge University Press, NY, 1986.
88. Lea R.G., Calder A.A. The immunology of pregnancy. Curr. Opin. Infect. Dis. 10:171-176, 1997.
89. Lee C.Y., Lee J.C. Staphylococcal capsule, pp. 361-366. En: Gram-positive pathogens. Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., Rood J.I. (ed.). ASM Press, Washington, DC, 2000.
90. Lie O., Solbu H., Syed M.A. Genetic association between bovine serum and colostrum lysozyme levels. Anim. Genet. 17:39-45, 1986.
91. Lowy F.D. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends Microbiol. 8:341-343, 2000.
92. Mallard B.A., Dekkers J.C., Ireland M.J., Leslie K.E., Sharif S., Lacey Vankampen C., Wagter L., Wilkie B.N. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. J. Dairy Sci. 81:585-595, 1998.
93. Mamo W., Froman G., Wadstrom T. Interaction of subepithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 18:163-176, 1988.
94. Mamo W., Lindahl M., Jonsson P. Binding of fibronectin and type II collagen to *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: reduction of binding after growth in milk whey. Microb. Pathog. 12:443-449, 1992.

95. Mamo W., Jonsson P., Flock J., Lindberg M., Muller H., Wadstrom T., Nelson N. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine* 12:988-992, 1994.
96. Mazanec M.B., Nedrud J.G., Kaetzel C.S., Lamm M.E. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol. Today* 14:430-435, 1993.
97. McBurney J.J., Meier H., Hoag W.G. Device for milking mice. *J. Lab. Clin. Med.* 64:485, 1964.
98. McGhee J.R., Mestecky J., Dertzbaugh M.T., Eldridge J.H., Hirasawa M., Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10:75-88, 1992.
99. McGhee J.R., Kiyono H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect. Agents Dis.* 2:55-73, 1993.
100. McGhee J.R., Lamm M.E., Strober W. Mucosal immune responses: an overview, pp. 485-506. En: *Mucosal Immunology*. Ogra P., Lamm M.E., Bienestock J., Mestecky J., Strober W., McGhee J.R. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, 1999.
101. McGuire T.C., Musoke A.J., Kurtti T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*. 38:249-256, 1979.
102. McKenney D., Pouliot K.L., Wang Y., Murthy V., Ulrich M., Döring G., Lee J.C., Goldmann D.A., Pier G. Broadly protective vaccine por *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284:1523-1527, 1999.
103. Menzies B.E., Kernodle D.S. Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from *Staphylococcus aureus* is protective in a murine model. *Infect. Immun.* 64:1839-1841, 1996.
104. Mombaerts P., Arnoldi J., Russ F., Tonegawa S., Kaufmann S.H.E. Different roles of α/β and γ/δ T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 365:53-56, 1993.
105. Morris Hooke A., Oeschger M.P., Zeligs B.J., Bellanti J.A. Ideal target organism for quantitative bactericidal assays. *Infect. Immun.* 20:406-411, 1978.
106. Morris Hooke A. Attenuated live bacteria: vaccine efficacy and shortcomings, pp. 167-184. En: *Towards better carbohydrate vaccines*. Bell Madsen R., Torrigiani G. John Wiley and Sons, NY, 1987.

107. Mueller R., Carroll E.J., Panico L. Complement C3 levels and haemolytic activity in normal and mastitic whey. *Zentralbl. Veterinarmed. [B]* 29:99-106, 1982.
108. Mueller R., Carroll E.J., Panico L. Hemolytic complement titers and complement C3 levels in endotoxin-induced mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 44:1442-1445, 1983.
109. Muller I., Cobbold S.P., Waldmann H., Kaufmann S.H.E. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective *in vivo* depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect. Immun.* 55:2037-2041, 1987.
110. Musoke A.J., Rurangirwa F.R., Nantulya VM. Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses, p. 393. En: *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. Morrison W.I. (ed.). Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, 1987.
111. Nashar T.O., Williams M.R., Brown P.J., Cripps P.J., Stokes C.R. Fate and uptake of soluble and particulate antigens in the preparturient bovine mammary gland. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26:125-141, 1990.
112. Nelson L., Flock J.I., Höök M., Lindberg M., Müller H.P., Wadstrom T. Adhesions in staphylococcal mastitis as vaccine components. *Flem. Vet. J.* 62 (S1): 111-125, 1991.
113. Newbould F.H. Phagocytic activity of bovine leukocytes during pregnancy. *Can. J. Comp. Med.* 40:111-116, 1976.
114. Nickerson S.C. Mastitis control: new horizons, pp. 221-230. En: *Proc. Natl. Mastitis Council, National Mastitis Council*, Arlington, VA, 1992.
115. Nickerson S. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet. Med.* 4:368, 1993.
116. Nickerson S.C., Owens W.E., Bodde R.L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J. Dairy Sci.* 78:1607-1618, 1995.
117. Nilsson I.M., Lee J.C., Bremell T., Ryden C., Tarkowski A. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect. Immun.* 65: 4216-4221, 1997.
118. Nordhaug M.L., Nesse L.L., Norcross N.L., Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J. Dairy Sci.* 77:1267-1275, 1994.
119. Nordhaug M.L., Nesse L.L., Norcross N.L., Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. *J. Dairy Sci.* 77:1276-1284, 1994.

120. Orme I.M. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 138:293-298, 1987.
121. Outteridge P.M., Lee C.S. The defence mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants, pp. 165-196. En: Prog. Vet. Microbiol. Immunol., vol 4: Moving Frontiers in Vet. Immunol. Pandey R. (ed.). Karger, NY, 1988.
122. Paape M.J., Wergin W.P., Guidry A.J., Schultze W.D. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. Adv. Exp. Med. Biol. 137:555-578, 1981.
123. Pankey J.W., Boddie N., Watts J.L., Nickerson S.C. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. J. Dairy Sci. 68:726-731, 1985.
124. Park Y.H., Fox L.K., Hamilton M.J., Davis W.C. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. J. Dairy Sci. 75:998-1006, 1992.
125. Park Y.H., Fox L.K., Hamilton M.J., Davis W.C. Suppression of proliferative response of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. Vet. Immunol. Immunopathol. 36:137-151, 1993.
126. Park Y.H., Jung S.C., Moon J.S., Ku B.G., Wyatt C.R., Hamilton M.J., Fox L.K., Davies W.C. A subset of mammary gland gamma-delta T lymphocytes downregulates BoCD4⁺ T lymphocytes response to *Staphylococcus aureus* in cattle with intramammary infection. Korean J. Immunol. 16: 19-27, 1994.
127. Parr E.L., Bozzola J.J., Parr M.B. Purification and measurement of secretory IgA in mouse milk. J. Immunol. Methods 180:147-157, 1995.
128. Patel A.H., Nowlan P., Weavers E.D., Foster T. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. Infect. Immun. 55:3103-3110, 1987.
129. Persson K., Sandgren C.H., Rodriguez-Martinez H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. Am. J. Vet. Res. 53:2235-2240, 1992.
130. Phonimdaeng P., O'Reilly M., Nowlan P., Bramley A.J., Foster T.J. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site specific coagulase-deficient mutants. Mol. Microbiol. 4:393-404, 1990.
131. Pilgrim H., De Ome K. Intraperitoneal pentobarbital anesthesia in mice. Exp. Med. Surg. 13:401-403, 1955.

132. Poutrel B., Rainard P. Hemolytic and bactericidal activities of bovine complement in mammary secretions of cows during the early nonlactating (dry) period. *Am. J. Vet. Res.* 47:1961-1962,1986.
133. Projan S.J., Novick R.P. The molecular basis of pathogenicity, pp. 55-81. En: *The staphylococci in human disease*. Crossley K.B., Archer G.L. (ed.). Churchill Livingstone Inc., NY, 1997.
134. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods* 188:117-128,1995.
135. Quiroga G.H., Nickerson S.C., Adkinson R.W. Histologic response of the heifer mammary gland to intramammary infusion of interleukin-2 or interferon-gamma. *J. Dairy Sci.* 76:2913-2924,1993.
136. Reiter B. Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum. *Ann. Rech. Vet.* 9:205-224,1978.
137. Riollot C., Rainard P., Poutrel B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytoquines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 7:161-167, 2000.
138. Riollot C., Rainard P., Poutrel B. Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Inflamm. Res.* 49:486-496, 2000.
139. Riollot C., Rainard P., Poutrel B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84:1077-1084, 2001.
140. Rivas A.L., Quimby F.W., Coksaygan O., Olmstead L., Lein D.H. Longitudinal evaluation of CD4+ and CD8+ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Can J. Vet. Res.* 64:232-237, 2000.
141. Roberts C.W., Satoskar A., Alexander J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitol. Today* 12:382-388, 1996.
142. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* 18:263-266, 1997.
143. Romani L., Puccetti P., Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:611-636, 1997.
144. Russell M.W., Mestecky J. Induction of the mucosal immune response. *Rev. Infect. Dis.* 10 (S2):440-446, 1988.

145. Selsted M.E., Tang Y.Q., Morris W.L., McGuire P.A., Novotny M.J., Smith W., Henschen A.H., Cullor J.S. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268:6641-6664,1993.
146. Service R.F. Triggering the first line of defense. *Science* 265:1522-1524, 1994.
147. Shafer-Weaver K.A., Sordillo L.M. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 79:1347-1352, 1996.
148. Shafer-Weaver K.A., Pighetti G.M., Sordillo L.M. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212:271-280, 1996.
149. Shafer-Weaver K.A., Sordillo L.M. Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56:53-64, 1997.
150. Smith K.L., Oliver S.P. Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland, p. 335. En: *The Ruminant Immune System*. Butler J.E. (ed.). Plenum Press, NY, 1981.
151. Sordelli D.O., Rojas R.A., Cerquetti M.C., Morris Hooke A., Degnan P.J., Bellanti J.A. Enzyme-linked immunosorbent assay antibody responses to a temperature-sensitive mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 50:324-327, 1985.
152. Sordelli D.O., García V.E., Fontán P.A., Cerquetti M.C., Morris-Hooke A. Intranasal immunization with temperature-sensitive mutants protects granulocytopenic mice from lethal pulmonary challenge with *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* 24:9-14, 1992.
153. Sordelli D.O., Cerquetti M.C., Buzzola F.R., García V.E., Gómez M.I., Morris Hooke A. Attenuated mutants of *Staphylococcus aureus* with two temperature-sensitive lesions: isolation and characterization. *Microbios* 94:95-102, 1998.
154. Sordelli D.O., Buzzola F.R., Gómez M.I., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Catalano M., Reitz A.J., Tollersrud T., Denamiel G., Jeric P., Lee J.C. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38:846-850, 2000.
155. Sordillo L.M., Nickerson S.C., Akers R.M., Oliver S.P. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* 19:1165-1172,1987.

156. Sordillo L.M., Campos M.Y., Babiuk L.A. Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74:3370-3375, 1991.
157. Sordillo L.M., Redmond M.J., Campos M., Warren L., Babiuk L.A. Cytokine activity in bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *Can. J. Vet. Res.* 55:298-301, 1991.
158. Sordillo L.M., Snider M., Hughes H., Afseth G., Campos M., Babiuk L.A. Pathological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74:4164-4174, 1991.
159. Sordillo L.M., Babiuk L.A. Modulation of mammary neutrophil function during the periparturient period following in vivo exposure to recombinant interferon-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:393-402, 1991.
160. Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865, 1997.
161. Sutra L., Poutrel B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89, 1994.
162. Tascon R.E., Stavropoulos E., Lukacs K.V., Colston M.J. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect. Immun.* 66:830-834, 1998.
163. Taylor B.C., Dellinger J.D., Cullor J.S., Stott J.L. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell. Immunol.* 156:245-253, 1994.
164. Taylor B.C., Keefe R.G., Dellinger J.D., Nakamura Y., Cullor J.S., Stott J.L. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell. Immunol.* 182:68-76, 1997.
165. Temple P.L., Kon K.S. A simple apparatus for milking small laboratory animals. *Biochem.* 31:2197-2198, 1937.
166. Thakker M., Park J.S., Carey V., Lee J.C. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* 66: 5183-5189, 1998.
167. Tollersrud T., Kenny K., Reitz A., Lee J.C.. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *S. aureus* and other *Staphylococcus* spp from Europe and the United States. *Infect. Immun.* 38:2998-3003, 2000.

168. Torre P.M., Konur P.K., Oliver S.P. Proliferative response of mammary gland mononuclear cells to recombinant bovine interleukin-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32:351-358, 1992.
169. Treece J.M., Morse G.E. y Levy C. Lipid Analysis of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 49:1240, 1966.
170. US Department of Health and Human Services. Guide for the care and use of laboratory animals. Public Health Service, Natli Inst Health, NIH Publication No. 86-23, Bethesda, Maryland, 1985.
171. van Ginkel F.W., Nguyen H.H., McGhee J.R. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 6:123-132, 2000.
172. Veldkamp K.E., Heezius H.C., Verhoef J., van Strijp J.A., van Kessel K.P. Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect. Immun.* 68:5908-5913, 2000.
173. Verhoef J. Host defense against infection. pp. 213-232. En: *The staphylococci in human disease.* Crossley K.B., Archer G.L. (ed.). Churchill Livingstone Inc., NY, 1997.
174. von Eiff C., Becker K., Metze D., Lubritz G., Hockmann J., Schwarz T., Peters G. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. *Clin Infect Dis.* 32:1643-1647, 2001.
175. Watson D.L. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res. Vet. Sci.* 45:16-21, 1988.
176. Watson D.L. *et al.* A field trial to test the efficacy of a *Staphylococcal* mastitis vaccine in comercial dairies in Australia, pp. 438-443. En: *Proc. Intl. Symp. Bov. Mastitis*, National Mastitis Council, and the AABP, West Lafayette, Ind., 1990.
177. Watson D.L. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. *Res. Vet. Sci.* 53:246-253, 1992.
178. Watson D.L., Davies H.I. Influence of adjuvants on the immune response of sheep to a novel *Staphylococcus aureus* vaccine. *Vet. Microbiol.* 34:139-153, 1993.
179. Watson D.L., McColl M.L., Davis H.I. Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments. *Aust. Vet. J.* 74:447-450, 1996.

180. Weisz-Carrington P., Roux M.E., Lamm E. Plasma cells and epithelial immunoglobulins in the mouse mammary gland during pregnancy and lactation. *J. Immunol.* 119:1306-1307, 1977.
181. Welkos S., O'Brien, A. Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. *Meth. Enzymol.* 235:29-39, 1994.
182. Yancey R.J. Jr., Sanchez M.S., Ford C.W. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:107-113, 1991.
183. Yancey R.J. Jr. Recent advances in bovine vaccine technology. *J. Dairy Sci.* 76: 2418-2436, 1993.
184. Yancey R.J. Jr. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv. Vet. Med.* 41:257-273, 1999.
185. Yang T.J., Mather J.F., Rabinovsky E.D. Changes in subpopulations of lymphocytes in peripheral blood, and supramammary and prescapular lymph nodes of cows with mastitis and normal cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 18:279-285, 1988.
186. Yao L., Bengualid V., Lowy F.D., Gibbons J.J., Hatcher V.B., Berman J.W. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. *Infect. Immun.* 63:1835-1839, 1995.
187. Yoshida K., Ichiman Y., Narikawa S. Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia. *J. Dairy Sci.* 67:620-627, 1984.
188. Yoshihara R., Shiozawa S., Fujita T., Chihara K. Gamma interferon is produced by human natural killer cells but not T cells during *Staphylococcus aureus* stimulation. *Infect. Immun.* 61:3117-3122, 1993.
189. Ziegler H.K., Skeen M.J., Pearce K.M. Role of α/β T and γ/δ T cells in innate and acquired immunity. *Ann. NY Acad. Sci.* 730:53-70, 1994.