

Tesis Doctoral

Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana

Chaneton, Luciano

2010

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:

Chaneton, Luciano. (2010). Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Chaneton, Luciano. "Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y
tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de
moléculas con acción antimicrobiana**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Biológica

Luciano Chaneton

Director de tesis: Dr. Leonardo E. Bussmann
Consejero de Estudios: Dr. Omar Pignataro
Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET
Buenos Aires, 2010

Esta tesis doctoral fue realizada en el marco de una Beca Interna Doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), dirigida por el Dr. Leonardo Bussmann.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Leonardo Bussmann por haberme dirigido y soportado estos años.

Al Dr. Enrique Segura y al grupo de biología del comportamiento por haberme alojado estos años.

Un preocupante número de personas ha participado en la elaboración de esta tesis. El propio Dr. Bussmann realizó algunos de los ensayos que se muestran. Javier Chaves, Liliana Tirante, Martín Pol, Julia Maito y Mercedes Gavidea, de *LactoDiagnósticoSur SRL*, realizaron los aislamientos microbiológicos y participaron en el diseño del estudio de vacas de primera lactancia. Con todos ellos tengo una deuda de gratitud y escritura. Una mención aparte merece Marcos Bontá quien realizó el trabajo de muestreo en vacas de primera lactancia y se tomó el Proyecto Mastitis Vaquillonas como una cuestión verdaderamente personal.

Quiero agradecer a Ines Bussmann quien realizó los cultivos celulares del apartado 3.4 de esta tesis y me contagió siempre de su buen humor.

Muchas instituciones aportaron insumos y servicios en forma absolutamente desinteresada. Biomeriux Argentina, DeLaval Bosio Argentina, Alecol-Larsa, FlechaBus y Dairy Farma.

Quiero agradecer a los amigos del IByME. A Gri por tanto café. A Mariano, y de nuevo a Gri por haber leído esta tesis. A Roxana Aragón y Aníbal Carbajo por la estadística. A los amigos que han soportado esta tesis eterna, Gurí, Alfo y Loche (cuyas historias nunca conducen a nada). A los espartanos que se preguntan por qué tardé tanto. También a los compañeros del día a día: Úrsula, el Mormón, Inti, Ale y Chechu.

Quiero, por último agradecer a Ana Laura Maglio quien tuvo que aprender sobre mastitis para poder ayudarme en la escritura de esta tesis y ha hecho un esfuerzo desproporcionado para que este doctorado llegue a término.

Nuevos enfoques en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la mastitis bovina a través del uso de moléculas con acción antimicrobiana

El objetivo de esta tesis fue caracterizar el papel de lactoferrina (LF) y otros factores solubles endógenos, en la defensa de la glándula mamaria contra la infección. También, se buscó analizar la potencial aplicación de estos elementos para el diagnóstico y la predicción de la mastitis bovina y para la generación de ganado resistente a esta enfermedad.

Para abordar estos objetivos se realizaron estudios bioquímicos, microbiológicos y epidemiológicos que se presentan en 4 apartados de resultados.

En el primer apartado de resultados se propuso estudiar la relación entre el incremento de los niveles de LF asociados a la infección intramamaria y el agente causal involucrado. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de LF aumenta con la infección clínica o subclínica y que la infección con *Streptococcus uberis* está asociada a mayores niveles de LF en leche. Además se demostró que *Strep. uberis* es capaz de inducir la síntesis de LF *in vitro* y que este microorganismo es resistente a LF, lo que estaría indicando una asociación entre la respuesta mediada por LF a la infección y la sensibilidad a LF de los patógenos.

En el segundo apartado de resultados se profundizaron los hallazgos del primero realizando un estudio de cohorte de 80 vacas durante una lactancia completa. Los resultados obtenidos permitieron determinar que la respuesta de LF es mayor en los primeros días de lactancia; que los cuartos mamarios positivos para infecciones presentan también concentraciones de LF aumentadas antes y después de la infección y que cuartos con mayores concentraciones de LF durante el parto presentan mayor riesgo de infectarse durante la lactancia.

En el tercer apartado de resultados se analizó la actividad antimicrobiana de β -lactoglobulina (β -LG) sobre bacterias causantes de mastitis. Se demostró que β -LG inhibe el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Strep. uberis* pero no el de *Escherichia coli* en forma dosis dependiente. Este espectro de inhibición parece complementario al de LF. Además, se hallaron diferencias de actividad específica entre dos variantes alélicas de β -LG: β -LG A y β -LG. Por último se demostró que LF y β -LG pueden actuar en conjunto para inhibir el crecimiento de *Strep. uberis* y *Staph. aureus*.

En el cuarto apartado de resultados se realizaron digestiones enzimáticas de LF y los péptidos obtenidos fueron caracterizados bioquímicamente y microbiológicamente. Uno de estos péptidos, identificado como la molécula lactoferricina (LFcin), presentó mayor actividad antimicrobiana que LF y una cinética de inhibición diferente. El péptido LFcin fue expresado en forma recombinante como proteína de fusión con β -LG en células CHO. Esta proteína quimérica demostró alta actividad antimicrobiana contra *Staph. aureus* y *Strep. uberis* pero no contra *E. coli*.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis aportan información relevante sobre el papel de LF y β -LG en la infección intramamaria y sobre la potencial aplicación diagnóstica y terapéutica de estos elementos.

Palabras clave: mastitis bovina, lactoglobulina, lactoferrina, lactoferricina, antimicrobianos, proteína quimérica.

New approaches in the diagnosis, prevention and treatment of bovine mastitis by using molecules with antimicrobial activity.

The aim of this thesis was to characterize the role of lactoferrin (LF) and other soluble factors in the defense of the mammary gland against infections. Additionally, we aimed to analyze the potential application of these elements in the diagnosis and prediction of bovine mastitis and in the generation of disease resistant cattle.

To address these objectives we carried out biochemical, microbiological and epidemiological studies that are presented in 4 sections of results.

In the first section we examined the relationship between the increase in LF levels associated with intramammary infection and the involved etiologic agent. Our results showed that the LF concentration increases upon clinical or subclinical infection and that infection with *Streptococcus uberis* is associated with the highest levels of LF in milk. We also showed that the challenge with *Strep. uberis* induced the synthesis of LF *in vitro* and that this microorganism is resistant to LF which suggests an association between infection response mediated by LF and pathogen susceptibility to this protein.

In the second section, we extended the findings made in section 1. To do that, we carried out a longitudinal study over 80 cows during a complete lactation. The results indicated that: 1) LF response to infection is greater in the early days of lactation than in later stages. 2) infected quarters presented augmented levels of LF at sample times before and after the time of infection 3) quarters with higher concentrations of LF during peripartum presented increased risk of becoming infected afterwards.

In the third section we analyzed the antimicrobial activity of β -lactoglobulin (β -LG) towards mastitis-causing bacteria. We demonstrated that β -LG inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* and *Strep. uberis* but not *Escherichia coli* in a dose-dependent manner. This inhibition spectrum was complementary to the observed for LF. We also found differences in specific activity between two allelic variants of β -LG: β -LG A and β -LG. Finally, we showed that LF and β -LG can act together to inhibit the growth of *Strep. uberis* and *Staph. aureus*.

In the fourth section, we performed enzymatic digestions of LF and the resulting peptides were characterized by means of biochemical and microbiological methods. One of the peptides obtained, identified as the molecule lactoferricin (LFcin), showed higher antimicrobial activity and different inhibition kinetics compared to LF. LFcin was expressed as a recombinant fusion protein with β -LG. When expressed in CHO cells, this chimeric protein showed high antimicrobial activity against *Staph. aureus* and *Strep. uberis* but not against *E. coli*.

Overall, the results presented in this thesis provide relevant information on the role of LF and β -LG in intramammary infection and on the potential application of these molecules in the fight against bovine mastitis.

Keywords: bovine mastitis, lactoglobulin, lactoferrin, lactoferricin, antimicrobial, chimeric protein

Algunos de los resultados presentados en esta tesis forman parte de los siguientes artículos.

Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland

Chaneton, L., L. Tirante, J. Maito, J. Chaves, and L. E. Bussmann.

Journal of Dairy Science. 91:1865–1873 (2008).

Antimicrobial activity of bovine β -lactoglobulin against mastitis-causing bacteria

Chaneton, L ., J. M. Pérez Sáez, and L. E. Bussmann.

Journal of Dairy Science (2010). En prensa

Índice

Abreviaturas utilizadas en este trabajo.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Mastitis.....	4
1.1.2. Tipos de mastitis.....	6
1.2. Diagnóstico de la mastitis.....	8
1.3. ¿Qué patógenos ocasionan las mastitis?.....	12
1.4. Incidencia y prevalencia de la mastitis.....	17
1.4.1. Incidencia y prevalencia e de mastitis en Argentina.....	19
1.5. ¿Por qué la mastitis bovina es tan frecuente?.....	21
1.6. Inmunidad de la glándula mamaria.....	22
1.7. Prevención y tratamiento de la mastitis bovina.....	25
1.8. Importancia de la mastitis.....	28
1.8.1. Importancia económica.....	28
1.8.2. Salud humana.....	30
1.8.3. Bienestar animal.....	31
1.9. Mastitis en vacas de primera lactancia.....	31
1.10. Lactoferrina.....	32
1.10.1. Estructura.....	33
1.10.2. Funciones y actividades de lactoferrina.....	34
1.10.3. Lactoferrina en la mastitis bovina.....	36
1.10.4. Péptidos derivados de lactoferrina.....	38
1.11. β -lactoglobulina.....	39
1.12. Objetivos.....	40
1.12.1. Objetivo general.....	40
1.12.2. Objetivos particulares.....	41
2. Materiales y métodos.....	42
2.1. Recolección de muestras y aislamientos microbiológicos.....	43
2.1.1. Vacas pluríparas.....	43
2.1.2. Vacas primíparas.....	44
2.2. Purificación y análisis de lactoferrina bovina.....	44
2.2.1. Purificación convencional de lactoferrina.....	44
2.2.2. Purificación en batch de lactoferrina.....	45
2.3. Purificación de β -lactoglobulina.....	45

2.4. Generación de anticuerpos contra lactoferrina.....	46
2.5. Cuantificación de lactoferrina por ELISA competitivo.....	47
2.6. Infección <i>in vitro</i> y análisis de la expresión de lactoferrina.....	48
2.7. Ensayos microbiológicos.....	49
2.7.1. Preparación de los inóculos.....	49
2.7.2. Análisis de actividad antimicrobiana.....	49
2.7.2.1. Evaluación de inhibición de crecimiento en placas de microtitulación.....	49
2.7.2.2. Evaluación de inhibición del crecimiento en microtubo y recuento en microgota.....	50
2.8. Tipificación molecular de aislamientos de <i>Streptococcus uberis</i>	51
2.9. Análisis de péptidos derivados de lactoferrina.....	51
2.9.1. Digestión de lactoferrina con pepsina.....	51
2.9.2. Cromatografía de intercambio catiónico.....	52
2.9.3. Cromatografía de tamiz molecular.....	52
2.10. Análisis de glicosilación.....	53
2.11. Electroforesis.....	54
2.12. Construcción de vectores y transducción.....	54
2.13. Análisis estadísticos.....	55
3. Resultados.....	59
3.1. Relación entre la respuesta de lactoferrina a la infección y la sensibilidad a lactoferrina por parte de patógenos causantes de mastitis.....	60
3.2. Lactoferrina y mastitis bovina en vacas de primera lactancia.....	68
3.3. Actividad antimicrobiana de β -lactoglobulina.....	84
3.4. Análisis de la potencial aplicación biotecnológica de péptidos derivados de lactoferrina.....	90
4. Discusión.....	104
4.1. Relación entre la respuesta de lactoferrina a la infección y la sensibilidad a LF por parte de patógenos causantes de mastitis.....	105
4.2. Lactoferrina y mastitis bovina en vacas de primera lactancia.....	108
4.3. Actividad Antimicrobiana de β -lactoglobulina.....	116
4.4. Análisis de al potencial aplicación biotecnológica de péptidos derivados de lactoferrina.....	118
5. Conclusiones.....	124
6. Referencias.....	127

Abreviaturas utilizadas en este trabajo.

aa	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
ATP	adenosin trifosfato
DCC	DeLaval cell counter
DMEM	medio Eagle modificado dulbeco
DO	densidad óptica
ECN	estafilococos coagulasa negativos
EEM	error estándar de la media
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
His	histidina
hTPA	activador tisular de plasminógeno humano
IDF	International Dairy Federation
IFN γ	Interferón γ
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina
IL-1 β	Interleuquina 1 β
kDa	kilodalton
LDH	lactato deshidrogenasa
LF	lactoferrina
LFampin	lactoferrampina
LFcin	lactoferricina
LPS	Lipopolisacárido
LTA	ácido lipoteicoico
NMC	National Mastitis Council
PAMP	patrón molecular asociado a patógeno
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PI	punto isoeléctrico
RCS	recuento de células somática
rhG-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos recombinante humano
ROC	Receiver Operating Characteristic
SAB	seroalbúmina bovina
SFB	suero fetal bovino
TMC	test de mastitis california
TNF	factor de necrosis tumoral

Abreviaturas

Tyr	tirosina
ua	Unidad de absorbancia
UFC	unidad formadora de colonia
UV	ultravioleta
β -LG	β -lactoglobulina

1. Introducción

1.1. Mastitis

La glándula mamaria de los mamíferos es un sistema de alveolos y túbulos que conducen hacia una cisterna que, a su vez, posee una salida al exterior a través de un pezón (figura 1.1.). En el caso de los bovinos, la ubre completa está compuesta por 4 glándulas o cuartos con un alto grado de independencia anatómica y funcional. Cada uno de estos alveolos está revestido de un epitelio que durante algunas etapas de la vida produce leche que se acumula en los túbulos y cisternas de la glándula mamaria.

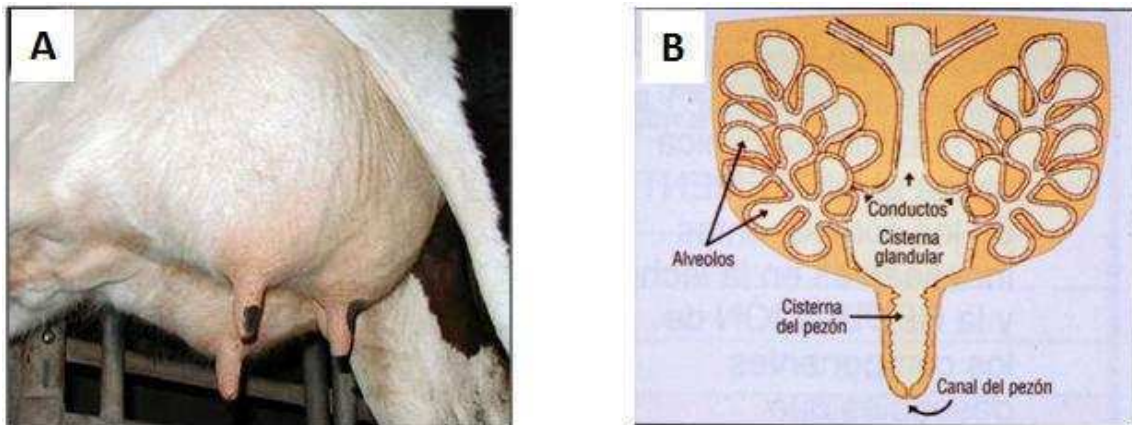


Figura 1.1. La glándula mamaria bovina. A: ubre de una vaca lechera. Se pueden observar las cuatro glándulas o cuartos. **B:** esquema de un cuarto mamario. Se indican: el canal y la cisterna del pezón, la cisterna glandular, los conductos galactóforos y los alveolos.

Para una bacteria que se encuentra en el exterior, se trata de una hendidura que se abre y se cierra, que aísla a un recinto, cerrado, húmedo, oscuro, caliente, completamente lleno de nutrientes y que provee una superficie donde adherirse y crecer. Es lógico que si alguna de estas bacterias lograra atravesar el esfínter del pezón, se reproduciría con significativa rapidez. Y dado que el planeta está

virtualmente cubierto de bacterias es de esperar que esto ocurra con relativa frecuencia.

Otra cosa que podría esperarse es que algunas bacterias se adapten a un ambiente como éste y lo conviertan en su principal nicho de supervivencia, convirtiéndose en parásitos obligados. En cualquier caso, si la presencia de la bacteria induce una reacción inflamatoria, este proceso se hará macroscópicamente visible y estaremos frente a un caso de mastitis.

En términos generales, la mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria mas allá de su causa, por lo tanto ésta es en realidad un signo y no una enfermedad en sí misma. Diferentes trastornos como trauma, estrés o infección pueden producir esta inflamación. Sin embargo, dado que es la infección la principal causa de inflamación, en general se entiende a la mastitis como la inflamación de la glándula mamaria producto de una infección. Innumerables agentes han sido descritos como capaces de penetrar y establecerse en la glándula mamaria bovina. Entre ellos se cuentan virus, hongos, algas, organismos eucariotas inferiores y bacterias. Dado que en la gran mayoría de los casos, son bacterias las responsables, en general, cuando hablamos de mastitis nos referimos a infecciones de la glándula mamaria producida por bacterias y es esta definición la que será utilizada a lo largo de este trabajo de tesis.

Por su enorme prevalencia y por las pérdidas económicas que ocasiona, la mastitis bovina es considerada la principal enfermedad del tambo. Además, el riesgo de transmisión de zoonosis y de dispersión de resistencia a antibióticos ha colocado a la mastitis bovina como un potencial problema de salud pública. Por otro lado, estudios recientes han demostrado el impacto ambiental que tienen los tambos con alta prevalencia de mastitis bovina (Hospido & Sonesson 2005).

La ocurrencia y la intensidad de un caso de mastitis dependen de numerosos factores que están asociados al animal infectado, a la bacteria patógena y al medio ambiente en que ambos se encuentren. El medio ambiente está a su vez determinado principalmente por las condiciones de manejo que se utilizan para con las vacas. Esta

característica multifactorial convierte a la mastitis en un problema complejo que requiere un abordaje multidisciplinario (figura 1.2).

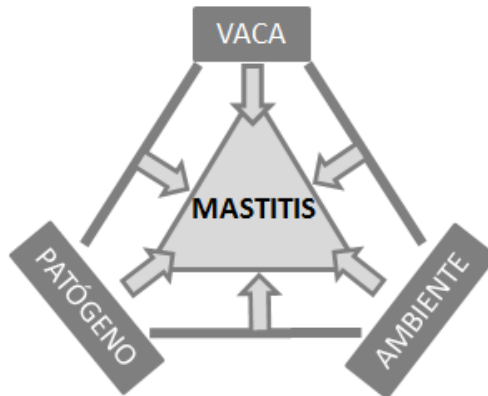


Figura 1.2. La mastitis bovina como un problema multifactorial. Tanto las características de la vaca como las del patógeno y el ambiente y las interacciones entre ellos determinan la ocurrencia, la duración y la intensidad de un caso de mastitis bovina.

1.1.2. Tipos de mastitis

Anteriormente se ha hecho referencia a la mastitis como la inflamación de la glándula mamaria producto de la infección bacteriana. Cuando esta inflamación es notoria y se manifiesta a través de signos evidentes como dolor, hinchazón y enrojecimiento de la ubre, secreción anormal con grumos y/o leche aguachenta, o signos sistémicos como fiebre, estamos frente a un caso de mastitis clínica. Además, existe otro tipo de mastitis que se caracteriza por la ausencia de estos signos, es detectada sólo mediante análisis bioquímicos y microbiológicos en la leche y se denomina mastitis subclínica. Encontramos entonces una forma clínica y una forma subclínica de mastitis. La mastitis subclínica es la que mayores pérdidas económicas ocasiona, debido a que genera una disminución en la cantidad y la calidad de la leche producida pero rara vez es tratada ya que en general pasa desapercibida para el

productor. Se ha estimado que por cada caso de mastitis clínica detectado, existen en un rodeo entre 15 y 40 casos de mastitis subclínica.

Que una infección intramamaria se desarrolle en forma clínica o subclínica depende de numerosos factores como la bacteria, el hospedador, las condiciones ambientales y de manejo, y el momento de la lactancia, así como también de interacciones complejas entre estos factores. Por lo tanto, ni el agente etiológico ni el huésped son, de por sí, predictivos del tipo de mastitis que encontraremos. Sin embargo, dada la interacción particular que algunos patógenos tienen con el huésped [por ejemplo la capacidad de activar o evadir el sistema inmune (ver apartado 1.3 ¿Qué patógenos ocasionan las mastitis?)], es posible establecer cierto grado de asociación entre el agente etiológico involucrado y el tipo de mastitis que éste causará. En otras palabras, algunos patógenos tienden a producir infecciones clínicas mientras que otros se ven más frecuentemente asociados a infecciones subclínicas. Se ha observado que ciertas infecciones subclínicas pueden venir seguidas de cuadros clínicos y que algunos casos clínicos derivan a su vez en infecciones subclínicas aunque, nuevamente, no es posible predecir los casos en los que esto ocurrirá.

En ciertas ocasiones, y dependiendo de las interacciones particulares que tengan con el huésped, (por ejemplo la capacidad de adherirse o internalizarse en el epitelio mamario) algunos patógenos pueden permanecer en la mama por períodos extensos generando mastitis crónica. En muchos casos, estas infecciones son refractarias al tratamiento con antibióticos y los animales afectados deben ser descartados.

Por último, y dentro de la mastitis clínica, encontramos casos de mastitis hiperaguda donde los síntomas se vuelven sistémicos y pueden incluso llegar a producir la muerte del animal. Nuevamente, esta condición hiperaguda está asociada principalmente con cierto tipo de agentes patógenos aunque, al igual que para las otras distinciones de mastitis mencionadas, no existe una relación unívoca entre una determinada especie bacteriana y la ocurrencia de mastitis hiperaguda.

En resumen, la mastitis bovina puede clasificarse en clínica y subclínica dependiendo de la presencia de signos evidentes de enfermedad y en crónica, aguda e hiperaguda dependiendo de la persistencia del patógeno y de la severidad de los signos observados (figura 1.3.).

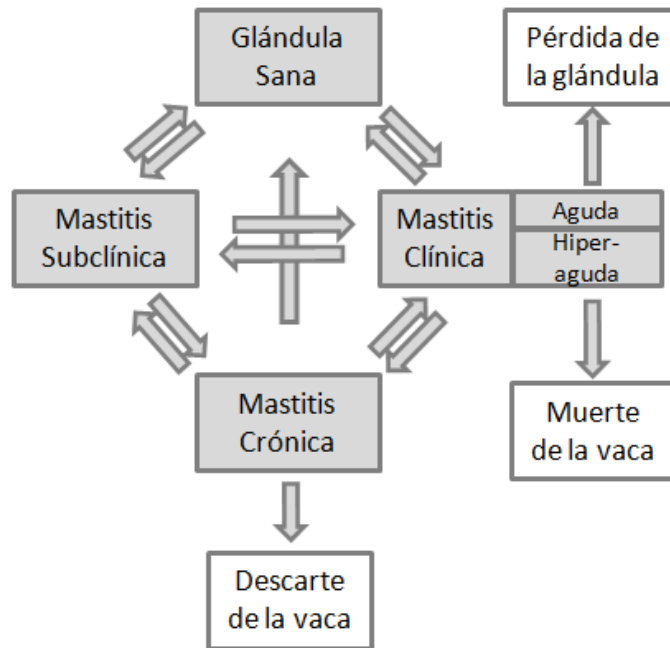


Figura 1.3. Las distintas formas de la mastitis y su dinámica. Se grafican los posibles estatus sanitarios de la glándula mamaria y el pasaje de un estado a otro. Las formas agudas e hiperagudas de la mastitis clínica pueden llevar a la pérdida de la glándula mamaria e incluso a la muerte del animal.

1.2. Diagnóstico de la mastitis

El rápido diagnóstico de la mastitis bovina es de capital importancia para la aplicación inmediata de medidas de control y tratamiento. Impidiendo que la infección

se agudice en la glándula afectada y se propague a otros animales, se espera reducir al máximo el costo económico de la enfermedad.

En el caso de la mastitis clínica, cuyos signos son evidentes, el diagnóstico es realizado directamente por el personal del establecimiento. En cambio, el diagnóstico de la mastitis subclínica presenta desafíos únicos, ya que depende de la evaluación de ciertos parámetros en la leche cuyos valores se alteran producto de la infección.

La evaluación del estatus sanitario puede realizarse sobre muestras de leche provenientes de cada una de las glándulas o cuartos individuales (muestra de cuarto individual), sobre la mezcla de leche de los cuatro cuartos (muestras compuestas) o sobre la mezcla de toda la leche ordeñada en un tambo (muestra de tanque). En este último caso no se obtiene información sobre vacas o glándulas individuales sino sobre el estatus sanitario general del tambo. El método más directo para realizar el diagnóstico de una infección subclínica es el análisis microbiológico de la leche. Aquí se evalúa la presencia de microorganismos causantes de mastitis mediante pruebas bioquímicas y cultivo en medios selectivos y diferenciales (Hogan *et al.* 1999). Pese a ser muy utilizado y dar información relevante sobre la situación infectológica de la mama, el análisis microbiológico es laborioso y de costo elevado. Además, algunos autores han reportado una baja sensibilidad para este método (Giannechini *et al.* 2002; Hoe & Ruegg 2005). En los últimos años, la utilización de técnicas moleculares como la PCR se está haciendo más frecuente para la detección de microorganismos que se encuentran en bajas concentraciones o que son difíciles de cultivar (Taponen *et al.* 2009).

Otros sistemas para evaluar el estatus sanitario de la glándula mamaria en ausencia de signos externos se centran en el análisis de la reacción inmunológica producto de la invasión bacteriana. El más utilizado de estos métodos es el recuento de células somáticas (RCS) en el cual se evalúa el número de células eucariotas presentes en la leche. En la glándula sana estas células son principalmente macrófagos, mientras que al producirse la infección ocurre un rápido incremento en el RCS y un cambio en su composición, pasando a ser neutrófilos en un 95%. Es decir, al medir el RCS estamos evaluando la cantidad de neutrófilos que han ingresado en la glándula

mamaria como parte de una reacción inflamatoria. La determinación del RCS puede realizarse a nivel de cuarto, vaca o tanque. A nivel de tanque, el RCS es muy utilizado para evaluar el estado sanitario general del tambo y altos niveles de RCS son indicativos de alta prevalencia de mastitis subclínica. Además, muchos países han incorporado sistemas de pago en el que se premia por bajo RCS o se castigo por altos valores de este parámetro.

La determinación del RCS puede realizarse por observación al microscopio de muestras de leche donde se cuentan en forma directa las células presentes; o por métodos electrónicos de citometría de flujo. En los últimos años han ingresado en el mercado sistemas electrónicos portátiles que se basan en fluorescencia como el DCC de Alpha Laval. Este método presenta la ventaja de que permite analizar el RCS al pie de la vaca de manera rápida y sencilla.

Otros métodos indirectos han sido desarrollados para evaluar la cantidad de células somáticas. Quizás el más utilizado de éstos sea el Test de Mastitis California (TMC), que permite medir en forma semicuantitativa los niveles de células somáticas (Schalm & NOORLANDER 1957). En este sistema se toman muestras de leche de cada cuarto y se les agrega un detergente que lisa las células eucariotas, liberando el ADN que aglutina formando un gel. La densidad de este gel es evaluada por el operador que asigna a la muestra un valor en una escala de 0 a 3. Esta técnica tiene las ventajas de ser rápida, barata, simple y de que puede ser realizada al pie de la vaca. Su principal desventaja radica en que es poco sensible y tiene un alto grado de subjetividad. Pese a que actualmente está siendo reemplazada por los métodos electrónicos antes descritos, aún es de gran utilidad para detectar cuartos subclínicos que son luego analizados con técnicas más sensibles.

El análisis microbiológico y el RCS constituyen los principales parámetros que indican si la glándula mamaria se encuentra o no subclínicamente infectada.

En general, se considera que un cuarto mamario que resulta positivo para el aislamiento microbiológico está infectado. En cuanto al RCS como criterio de infección, no existe un consenso acerca del punto de corte a partir del cual un cuarto mamario se

considera infectado, aunque en general se asume que a partir de un RCS de 200.000 se está en presencia de un proceso inflamatorio (Schukken *et al.* 2003; Pyorala 2003). Es posible también utilizar ambos criterios en forma combinada tal como lo recomienda la International Dairy Federation (IDF) (cuadro 1.1).

Resultados de la muestra de leche		Diagnóstico
Aislamiento microbiológico positivo	RCS >200.000	
No	No	Cuarto/vaca sana
Si	No	Infección latente
No	Si	Mastitis/Infección inespecífica
Sí	Sí	Mastitis subclínica

Cuadro 1.1. Clasificación de los tipos de infección intramamaria según la Interanational Dairy Federation. Adaptado de Pyorala *et al.* (2003).

Además del RCS y el análisis bacteriológico, otros métodos que se basan en la detección de cambios en la composición química de la leche han sido incorporados a la detección de la mastitis. Entre ellos cabe destacar el análisis de la actividad enzimática de N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGasa), la concentración de lactosa y la conductividad y pH en leche (Viguier *et al.* 2009). Recientemente, estudios de expresión diferencial por electroforesis en dos dimensiones han identificado una gran cantidad de marcadores candidatos para mastitis (Viguier *et al.* 2009). Además, el uso de técnicas inmunológicas como el ELISA promete ser un complemento ideal para el desarrollo de estos marcadores, permitiendo detectar tanto proteínas del huésped cuya expresión se ve alterada por la infección como moléculas propias de patógenos invasores. Otras técnicas, como la PCR en tiempo real, aparecen como alternativas atractivas para identificar patógenos particulares. Dada la necesidad de acelerar y simplificar el diagnóstico de la mastitis, se están ensayando algunos métodos que pueden ser utilizados en el propio tambo. Entre estas técnicas se incluyen: la medición de temperatura de la ubre por cámara infrarroja, el análisis de LDH, esterases celulares y ATP mediante métodos portátiles y el DCC de Alpha Laval ya mencionado. Algunos

métodos para la detección “en línea” de mastitis ya son utilizados en tambos robotizados. La mayoría de ellos se basan en el análisis de la conductividad eléctrica, el color y el RCS de la leche. Actualmente, se están poniendo a prueba otros métodos basados en narices y lenguas electrónicas, capaces de detectar la presencia de productos solubles o volátiles diferencialmente representados en la leche mastítica (Viguiet *et al.* 2009).

El continuo descubrimiento de biomarcadores de mastitis y la creciente incorporación de tecnología de punta en el tambo prometen el desarrollo de técnicas cada vez más rápidas y precisas para detectar las infecciones mamarias. Sin embargo, los métodos tradicionales como el análisis microbiológico y el recuento de células somáticas continúan siendo el estándar dorado para la evaluación del estatus sanitario de la glándula mamaria.

1.3. ¿Qué patógenos ocasionan las mastitis?

Una gran cantidad de especies bacterianas han sido aisladas de glándulas mamarias bovinas infectadas (Watts 1988). Esta característica típicamente multietiológica de la mastitis es uno de los factores que determina la complejidad de su abordaje. Sin embargo, la gran mayoría de las infecciones reportadas son producidas por un número relativamente pequeño de especies de bacterias.

Dependiendo de su hábitat principal y de su forma de transmisión, las bacterias causantes de mastitis han sido divididas en patógenos contagiosos y ambientales. Esta diferencia de nicho primario tiene influencia en la forma en que estos microorganismos interaccionan con la glándula mamaria y, en consecuencia, en el tipo de mastitis que producen.

Los patógenos ambientales se encuentran en el ambiente donde vive la vaca; pasturas, cama, excremento etc., y pasan a la ubre en los períodos entre ordeño. Al no estar adaptados a la mama, algunos de estos patógenos producen respuestas inflamatorias importantes que se traduces en casos de mastitis clínica que suelen durar poco tiempo. Entre los patógenos ambientales se encuentran bacterias Gram

positivas como *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y los estafilococos coagulasa negativos (ECN), y Gram negativas representadas principalmente por bacterias coliformes.

Los patógenos contagiosos, por otro lado, tienen su hábitat fundamental en la glándula mamaria bovina y se transmiten de ubre a ubre principalmente durante el ordeño. Debido a su larga historia de interacción con la glándula mamaria, estos microorganismos se han adaptado a las condiciones de este nicho particular, desarrollando estrategias para evadir el sistema inmune y permanecer en la mama (Guinane *et al.* 2010; Almeida *et al.* 1999; Leigh *et al.* 1990; Bradley & Green 2001; Ward *et al.* 2009). De este modo, suelen estar asociados a mastitis subclínicas y crónicas. Los patógenos contagiosos más prevalentes son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* y algunas especies de *Mycoplasma*.

Esta clasificación clásica es de uso muy difundido, aunque la evidencia más reciente sugiere que muchos patógenos ambientales pueden comportarse como contagiosos y viceversa, aportando un grado más de complejidad al abordaje de esta enfermedad.

En cuanto a la magnitud de las alteraciones que producen, los patógenos bovinos han sido clasificados en mayores y menores. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* y las bacterias coliformes son consideradas patógenos mayores, dado que son capaces de producir infecciones clínicas agudas con pronunciados aumentos en el RCS y pérdida de la función glandular que, en ocasiones, no vuelve a recuperarse en toda la lactancia. Por otro lado, *Corinebacterium bovis* y los ECN representan típicamente patógenos menores que producen infecciones leves, con un moderado aumento en el RCS. Éstos no suelen estar asociados a afecciones clínicas.

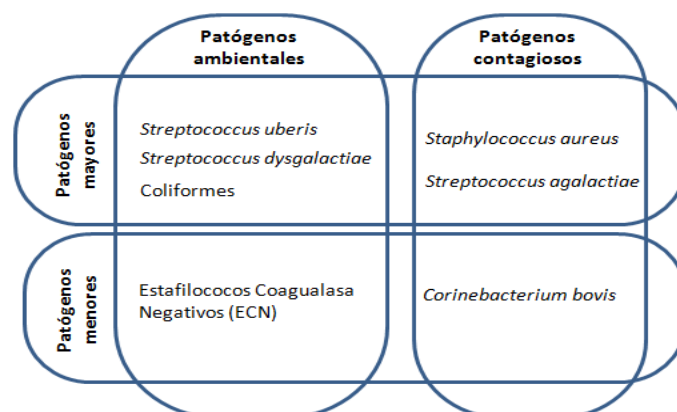


Figura 1.3. Clasificación clásica de los principales microorganismos causantes de mastitis en contagiosos /ambientales y mayores / menores.

Al igual que la clasificación contagioso/ambiental, la clasificación mayor y menor se encuentra en revisión. Algunos autores señalan que, por ejemplo, los ECN son capaces de producir infecciones importantes con gran incremento en el RCS, por lo que estarían comportándose como microorganismos mayores (Nickerson *et al.* 1995; Pyorala & Taponen 2009).

A continuación se presentará un breve resumen de las características de los principales microorganismos causantes de mastitis.

Streptococcus agalactiae. La fuente primaria de *Strep. agalactiae* es la ubre de vacas infectadas. Es considerado un parásito obligado que pasa de ubre a ubre durante el ordeño. Es altamente contagioso y produce un gran aumento en el RCS del cuarto afectado. Unos pocos cuartos infectados con *Strep. agalactiae* son capaces de deteriorar la calidad de la leche de todo el rodeo. Es sensible a penicilina y es posible erradicarlo de los rodeos mediante tratamiento antibiótico. La implementación de buenas prácticas de manejo en el tambo en los países desarrollados ha producido una marcada disminución de la prevalencia de este microorganismo en los últimos años (Zadoks & Fitzpatrick 2009).

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos causantes de mastitis. La fuente primaria de este microorganismo es la glándula mamaria. A diferencia de otros microorganismos contagiosos, no coloniza la piel sana del pezón pero se lo halla frecuentemente si se producen lesiones en la misma. Este microorganismos suele producir infecciones crónicas subclínicas con aparición esporádica de síntomas clínicos leves. Sin embargo, algunas infecciones pueden ser clínicas o incluso de tipo gangrenoso (Schalm *et al.* 1976). La respuesta al tratamiento con antibióticos durante la lactancia no suele superar el 50 / . Sin embargo, la prevalencia de *Staph. aureus* puede ser reducida dramáticamente mediante la implementación de estrictas normas de higiene durante el ordeño, la segregación de los animales infectados y la terapia de vaca seca. *Staph. aureus* es una bacteria que

está adaptada a la vida dentro de la glándula mamaria y posee múltiples mecanismos de supervivencia que favorecen la evasión del sistema inmune y la permanencia en la glándula mamaria (Sutra & Poutrel 1994).

Los **ECN** son un grupo diverso cuyos representantes más importantes son *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri* y *Staphylococcus cohnii*. Son patógenos oportunistas que pueden ser parte de la flora normal del pezón o habitar el medioambiente de la vaca. Algunos de estos microorganismos son capaces de colonizar la glándula mamaria y permanecer en ella por períodos prolongados. Los ECN suelen ser las bacterias más prevalentes en los tambos bien manejados o de vacas de primera parición (Matthews *et al.* 1992). Producen un moderado incremento en el RCS y su control está basado en buenas técnicas de manejo y terapia de vaca seca. Sin embargo, estudios recientes que muestran infecciones graves producto de ECNs han puesto en duda el clásico rótulo de patógenos menores con el que se ha designado a estos microorganismos (Taponen & Pyorala 2009). En los últimos años, se ha observado un incremento de la prevalencia de este grupo de microorganismos asociado a la disminución de patógenos mayores contagiosos. En algunas regiones, los ECN son el principal agente causal de mastitis (Schukken *et al.* 2009).

Las bacterias **coliformes** causantes de mastitis están representadas principalmente por *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Enterobacter sp*. Como ya se ha mencionado, son microorganismos ambientales que provienen de la cama, el agua o las pasturas. La mayoría de las infecciones por coliformes se dan en el parto y los primeros días de secado y pueden evitarse manteniendo a los animales lejos de ambientes húmedos oscuros y barrocos. La mayoría de los casos de mastitis clínica por coliformes presentan signos moderados que se resuelven espontáneamente. Sin embargo, en ciertos casos pueden producir mastitis hiperaguda, poniendo en peligro la vida del animal. El uso de antibióticos para tratar infecciones por coliformes es de poca utilidad y en los casos hiperagudos suele ser necesario el uso de terapia de soporte sistémico. En tambos con buen manejo sanitario, se observa un incremento de la

frecuencia relativa de las infecciones por coliformes. Esto probablemente se deba a que en estos tambos, el nicho mamario se encuentra libre de microorganismos competidores del tipo contagioso como *Staph. aureus* (Bradley & Green 1997).

Los **estreptococos ambientales** están representados principalmente por *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae*. Son microorganismos ambientales aunque se considera que *Streptococcus dysgalactiae* también puede transmitirse de vaca a vaca. El período de mayor susceptibilidad de la glándula mamaria a estos patógenos es el secado. Algunas de estas infecciones por estreptococos ambientales pueden volverse crónicas. En los casos clínicos se observan, en general, signos moderados. Los métodos de control de estos patógenos incluyen terapia de vaca seca y desinfección del pezón pre y post ordeño. Algunos estudios de genotipo molecular han demostrado un alto grado de heterogeneidad en las cepas de *Strep. uberis* que infectan a la glándula mamaria dentro de un tambo particular, denotando el carácter ambiental de este microorganismo (Douglas *et al.* 2000). Sin embargo, la existencia de infecciones persistentes de *Strep. uberis* (Todhunter *et al.* 1995), el descubrimiento de cepas predominantes en algunos rodeos (Zadoks *et al.* 2003b) y el hallazgo de mecanismos de adaptación de nicho (Leigh 1999) han puesto en duda el carácter puramente oportunista de este microorganismo, sugiriendo que ciertas cepas se han adaptado a la glándula mamaria y la han convertido en su nicho primario. En cualquier caso, el análisis de genoma completo de *Strep. uberis* muestra una amplia diversidad metabólica que permite a esta bacteria sobrevivir en ambientes tan diversos como el rumen, el material de la cama o las pasturas y la propia glándula mamaria (Ward *et al.* 2009).

El carácter multietiológico de la mastitis bovina también puede ponerse de manifiesto dentro de una misma glándula mamaria. Es decir, más de un patógeno diferente puede estar presente en una misma glándula al mismo tiempo y es probable que se produzca algún tipo de competencia por el nicho (Lam *et al.* 1997; Woodward *et al.* 1987). Evidencia de este fenómeno es el incremento en la frecuencia relativa de los patógenos ambientales al reducirse los patógenos contagiosos por la implementación de buenas prácticas de manejo en el tambo (Bradley 2002). Además, se ha reportado el papel protector de patógenos menores como *Corinebacterium bovis*

y los ECN contra infecciones por patógenos mayores (Matthews *et al.* 1990; Pankey *et al.* 1985). Estos hallazgos han llevado a algunos autores a proponer el uso de bacterias probióticas como método para combatir la mastitis bovina (Bradley 2002). Otra forma de interacción entre especies bacterianas dentro de la glándula mamaria es a través del sistema inmune. La infección subclínica por un patógeno menor, por ejemplo, puede activar la inmunidad de la mama haciendo que se torne más resistente a infecciones clínicas por patógenos mayores. Por ejemplo, se ha reportado que vacas positivas para ECN producen mayor cantidad de leche que vacas sanas, aunque las primeras presenten niveles aumentados de RCS (Piepers *et al.* 2010). En consistencia con esto, numerosos trabajos muestran que tambos con bajos niveles generales de infección (medido por el RCS en la leche del tanque) presentan una mayor prevalencia de patógenos ambientales y un mayor número de casos clínicos que tambos con altas células (Barkema *et al.* 1998; Elbers *et al.* 1998; Suriyasathaporn *et al.* 2000).

La importancia relativa que tiene cada patógeno de la glándula mamaria está determinada por el impacto sobre la producción de leche a nivel de rodeo. A su vez, este impacto estará dado por factores tales como la intensidad y la persistencia de la infección, la persistencia de las alteraciones producidas y la capacidad del microorganismo de dispersarse en el rodeo.

1.4. Incidencia y prevalencia de la mastitis

La mastitis bovina es una afección tremendamente frecuente. En Inglaterra por ejemplo, se calcula que la incidencia de mastitis clínica es de 40 casos cada 100 vacas por año (Bradley 2002). Valores similares se han reportado para otros países de Europa (Viguié *et al.* 2009). Aunque la información es más escasa en este sentido, se calcula un número muy superior para los casos subclínicos. Tanto la incidencia como la prevalencia de mastitis dependen de numerosos factores. Se ha demostrado, por ejemplo, que un cuarto mamario tiene mayor probabilidad de infectarse al aumentar el número de parición. Es decir, vacas más viejas se infectan con mayor frecuencia (Barkema *et al.* 1998). Por otro lado, dentro de una lactancia particular, el mayor número de infecciones ocurre durante el parto (Vangroenweghe *et al.* 2005;

Calvinho *et al.* 2007) y al comienzo del periodo de secado cuando la lactancia está cesando (Oliver & Mitchell 1983). Con respecto a estas variaciones, numerosas líneas de evidencia indican que durante los primeros días de lactancia ocurre en la glándula mamaria una marcada inmunosupresión asociada al estrés del parto y al comienzo del proceso de lactación (Compton *et al.* 2009). Esto favorecería la aparición de infecciones nuevas y la manifestación de infecciones preexistentes que han permanecido latentes durante el periodo de secado (Robert *et al.* 2006). Además, se ha reportado que la severidad de las infecciones clínicas es mayor en este periodo que en otros momentos de la lactancia (Burvenich *et al.* 2003; Lehtolainen *et al.* 2003), lo cual ha sido asociado a un menor número inicial de células del sistema inmune y a una menor velocidad de reclutamiento de las mismas.

Con respecto al segundo período de alta prevalencia de infecciones, el inicio del secado, la hipótesis más apoyada es que, al cesar el ordeño, se produce una acumulación de leche en la cisterna de la glándula, lo que a su vez induce un aumento de la presión hidrostática en la mama (Oliver & Mitchell 1983). Se ha observado que este aumento de presión dilata el esfínter del pezón, produciendo pérdida de leche y permitiendo la entrada de agentes patógenos. Además, al cesar el ordeño, las bacterias que se acumulan en el canal del pezón ya no son arrastradas hacia afuera con la eyección de leche, teniendo mayor oportunidad de alcanzar la cisterna de la glándula y producir una infección exitosa. Este incremento en la sensibilidad es máximo durante los primeros días de secado, para disminuir luego debido al aumento de la concentración de algunos factores de la inmunidad innata (Kuttila *et al.* 2003), al descenso de la presión hidrostática de la glándula producto de la reabsorción de leche y a la formación completa del tapón de queratina en el canal del pezón (Nickerson 1989).

En una escala temporal más amplia, la prevalencia de mastitis bovina ha variado con el correr de los años. La aplicación en los años 70 del Programa de 5 Puntos para el control de la mastitis bovina (ver más adelante) (Neave *et al.* 1969) ha producido una marcada reducción en la prevalencia y un cambio en la etiología de las infecciones clínicas y subclínicas. Estos cambios están asociados a la reducción del

número de patógenos contagiosos producto de las mejoras sanitarias en los tambos. De esta manera, en países desarrollados como EEUU o Inglaterra, se observa una reducción en la frecuencia de aislamientos de patógenos contagiosos como *Staph. aureus* o *Strep. agalactiae* mientras que la prevalencia de microorganismos ambientales como *Strep. uberis* o *E. coli* se ha mantenido constante o incluso ha aumentado (Bradley 2002; Zadoks & Fitzpatrick 2009).

1.4.1. Incidencia y prevalencia de mastitis en Argentina

La producción lechera en la República Argentina está concentrada principalmente en las provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Buenos Aires y La Pampa y se caracteriza por un elevado número de tambos y un número más o menos pequeño de industrias procesadoras. Al igual que otras actividades económicas, la producción de leche ha seguido los altibajos de la economía argentina, experimentado un crecimiento sostenido durante la década del 90, una depresión con la crisis de 2001 y una recuperación hacia el 2004. Pese a esto, se observa desde principios de los 90 un crecimiento en la producción que llevó de 5.892 millones de litros en 1991 a 10.052 millones de litros en 2009 (Subsecretaría de Agricultura, 2010). Al igual que en otros países, este crecimiento se vio acompañando por una disminución en el número de tambos, un aumento en el número de vacas por tambo y un incremento en la productividad medida en kg producido por gigavatio por hectárea. La producción lechera en el país se ha caracterizado por la utilización de sistemas de pastoreo, aunque en los últimos años se viene incrementando el uso de sistemas semipastoriles o intensivos. De esta manera, actualmente existe en Argentina todo el espectro de explotaciones, desde un pequeño número de megatambos que se caracterizan por la eficiente utilización de tecnología de punta, hasta tambos pequeños que en muchos casos se encuentran al margen de los sistemas regulatorios.

En Argentina, la mastitis es una enfermedad aún muy prevalente. Pese a que no existen estadísticas actualizadas en este sentido, a principios de la década del 80 se calculaba que las pérdidas económicas asociadas a la mastitis bovina ascendían a los

220 millones de dólares anuales (Asociación Argentina de Lucha Contra Mastitis 1983). Estudios sobre cuartos mamarios tomados al azar muestran una prevalencia del 35 / de cuartos mamarios positivos para aislamientos microbianos (Giraud *et al.* 1995), siendo los patógenos más frecuentes los ECN (12,2 /), especies de estreptococos (8,13 /) y *Staph. aureus* (5,9 /). Otros estudios sobre muestras compuestas de vacas tomadas al azar arrojaron resultados similares: 16,6 para ECN y 13,9 para *Staph. aureus* (Amand de Mendieta *et al.* 2001).

Con respecto a la frecuencia relativa de los patógenos causantes de mastitis subclínica, un estudio de muestras compuestas que resultaron positivas para el Test de Mastitis California, mostró que los patógenos más frecuente fueron *Staph. aureus* y los ECN, representando respectivamente un 25 y un 22 / de las muestras positivas para aislamiento microbiano (Chertcoff *et al.* 1996). Estudios similares también para muestras subclínicas compuestas revelaron que *Staph. aureus* fue el patógeno mayor más frecuentemente aislado, aunque también se observó una alta prevalencia de *Strep. agalactiae* (Tirante *et al.* 1998).

Aparentemente, *Staph. aureus* es el patógeno mayor más frecuente en los tambos argentinos. Sin embargo hay que tener en cuenta que existen diferencias en la prevalencia e incidencia de infecciones y en la importancia relativa de los distintos agentes patógenos involucrados entre cuencas lecheras y años de muestreo (Calvinho & Tirante 2005).

Con respecto a la mastitis clínica, los datos son también escasos. González y Echaide (1983) han reportado incidencias trimestrales de 29; 7,8; 9,8 y 14 / . Con respecto a los agentes etiológicos de las infecciones clínicas en Argentina, diferentes estudios indican que el más frecuente es *Staph. aureus*, seguido de ECN y *Strep. agalactiae*. Nuevamente, en este caso se observan diferencias entre los estudios publicados (Calvinho & Tirante 2005).

Con respecto a las infecciones en vaquillonas, estudios pioneros han mostrado un 37 / de cuartos infectados con distintas especies de *Staphylococcus* (Chaves *et al.* 2010). Por otro lado, Calvinho *et al.* (2007) mostraron un 29 / de cuartos positivos

para aislamiento microbiológico en vaquillonas 14 días antes del parto y un 15 / 7 días después del parto. En este estudio los principales agentes etiológicos fueron los ECN y *Staph. aureus*.

Otras estrategias para evaluar la salud de la glándula mamaria, como el Test de Mastitis California han mostrado frecuencias del 39 / y 53 / de cuartos positivos para tambos con ordeño manual y mecánico respectivamente (Romano *et al.* 1978). Con respecto al análisis directo de RCS en el tanque, diferentes trabajos muestran valores que van de las 300.000 a las 690.00 células por mililitro (Calvinho & Tirante 2005). A lo largo de los años es posible observar una tendencia hacia la reducción de este valor, probablemente motivada por la incorporación en los años 90 de políticas de penalización por alto RCS (Calvinho & Tirante 2005).

A diferencia de lo que ocurre en los países desarrollados, en la Argentina los patógenos contagiosos son todavía muy prevalentes y los valores de células somáticas altos. Esto probablemente se debe a la falta de implementación continua de medidas sistemáticas de control. Los datos actuales no parecen mostrar una tendencia hacia la reducción de los patógenos contagiosos (Calvinho & Tirante 2005). Sin embargo la tendencia observada hacia la reducción del RCS a nivel de tanque sugiere que la generalización y profundización de las medidas de control de mastitis podría reducir fuertemente la importancia de estos patógenos. Por último, es notoria la escasa información existente con respecto a la mastitis en Argentina. Siendo un país de creciente desarrollo lechero y con aparentes problemas para el control de la mastitis bovina, es evidente la necesidad de un incremento en la investigación científica que provea conocimiento básico e información práctica desde una perspectiva local.

1.5. ¿Por qué la mastitis bovina es tan frecuente?

A través de miles de años de cría selectiva, hemos convertido al ganado lechero en una maquinaria perfecta de generar proteínas y grasa. Es claro que una vaca de tambo produce mucha más leche de la necesaria para alimentar a su cría. En los últimos años, la introducción de biotecnologías, como la inseminación artificial o la

transferencia embrionaria, junto con la utilización de métodos de selección asociadas a marcadores moleculares, han acelerado notablemente el incremento de la productividad por animal. Los altos niveles de producción junto con el ordeño frecuente producen una situación de estrés constante en la glándula mamaria que puede derivar en una inmunosupresión de la misma. En conjunto, estas condiciones proveen la situación ideal para que un microorganismo invada la glándula mamaria y se reproduzca dentro de ella. Además, se ha reportado una correlación positiva entre la producción lechera y el riesgo de infección (Heringstad *et al.* 2003). En otras palabras, al seleccionar durante siglos a vacas más productoras hemos seleccionado a vacas más sensibles a la mastitis.

Por su parte, los altos niveles de producción lechera se ven asociados a problemas en el cierre del pezón luego de cada ordeño, lo que facilita la entrada de bacterias y otros microorganismos (Klaas *et al.* 2005). A su vez, el alto grado de hacinamiento, propio de algunos sistemas productivos puede favorecer el pasaje de ubre a ubre de algunos microorganismos.

En otras palabras la alta producción lechera, el ordeño constante y las condiciones de vida a las que son sometidas, han hecho de las vacas de tambo un blanco ideal para las infecciones intramamarias.

1.6. Inmunidad de la glándula mamaria

La glándula mamaria cuenta con una batería de elementos para la defensa contra la entrada y proliferación de los distintos patógenos. El pronunciado aumento en la sensibilidad a mastitis que se observa en el periparto y al inicio del secado ha sido asociado a deficiencias en la función de estos elementos (Mallard *et al.* 1998). La primer línea de defensa, y quizás la más importante, es de tipo anatómico y consiste en el esfínter del pezón que se cierra estrechamente en el periodo entre ordeño. Un impedimento en la función de este esfínter ha sido asociado a una mayor susceptibilidad a las infecciones (Klaas *et al.* 2005; Cousins *et al.* 1980). A su vez, el canal del pezón está revestido internamente por queratina, que es capaz de retener

mediante interacciones electrostáticas a las bacterias que están ingresando en la ubre. En esta capa de queratina se encuentran también proteínas y lípidos con capacidad bacteriostática (Sordillo *et al.* 1997). Al finalizar la lactancia, durante el secado, esta queratina forma un tapón que ocluye el canal del pezón. Problemas en la formación de este tapón han sido vinculados a mayor riesgo de infección (Dingwell *et al.* 2004). De hecho, y como se menciona más arriba, se cree que la apertura parcial del esfínter debido al aumento de la presión en la cisterna de la glándula, que se produce en los días previos al parto y en los primeros días de involución, es una de las principales causas de la alta tasa de infección registrada en estos periodos (Nickerson 1989). Una vez que un patógeno logra atravesar el esfínter del pezón, se encontrará con factores celulares y solubles de la inmunidad innata y adaptativa. Estos dos tipos de inmunidad, que comparten elementos efectores y colaboran estrechamente en la defensa de la glándula mamaria, difieren fundamentalmente en la forma de reconocer la entrada de agentes patógenos. La inmunidad innata es la primera en activarse frente a la entrada de elementos extraños y ha evolucionado para reconocer patrones moleculares típicos de patógenos (PAMPs) como lipopolisacárido (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) o péptidoglicano, a través de receptores tipo Toll en la membrana de macrófagos y células epiteliales. Cuando los PAMPs de un patógeno que ha logrado penetrar en la glándula mamaria son reconocidos, se inducirá la síntesis de citoquinas pro inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (Sordillo & Streicher 2002). Estas citoquinas promoverán a su vez la migración de neutrófilos del torrente sanguíneo al lumen de la glándula mamaria. Los neutrófilos constituyen unos de los principales efectores de la inmunidad de glándula mamaria bovina y son capaces de fagocitar y ejercer actividad citotóxica mediante shock respiratorio sobre las bacterias invasoras. En una glándula mamaria sana los macrófagos constituyen el tipo celular predominante; su función es fagocitar elementos extraños, presentarlos a células de la inmunidad adaptativa y, como ya se ha mencionado, secretar citoquinas que activarán la migración de neutrófilos (Sordillo & Streicher 2002). Se cree que la severidad de la mastitis está por lo menos en parte influenciada por la velocidad de reclutamiento de estos neutrófilos (Shuster *et al.* 1996; Rainard & Riollot 2003). Durante el parto, la actividad de los neutrófilos

reclutados se encuentra parcialmente impedida lo que ha sido asociado con la susceptibilidad aumentada de la glándula mamaria en este periodo. Varios trabajos han vinculado la inmunosupresión que se observa en el periparto con una menor actividad de neutrófilos (Mehrzaad *et al.* 2002; Mallard *et al.* 1998). A su vez este impedimento ha sido asociado a cambios en la expresión génicas de estas células producto de las alteraciones endócrinas propias del parto (Burton *et al.* 2005; Da Silva *et al.* 1998). Otros autores han vinculado el balance energético negativo que se produce en el periparto con la disminución en la función de estas células (Lacetera *et al.* 2004; van Kneegsel *et al.* 2007). Por otro lado, se ha propuesto que el descenso en los niveles del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF 1) reduce el tiempo de vida de los neutrófilos y gatilla una disminución en la secreción de citoquinas proinflamatorias con el consecuente impedimento en la resolución de la infección (Vangroenweghe *et al.* 2005).

Además de estos factores celulares, la inmunidad innata cuenta con elementos solubles como defensinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa y factores del complemento que son capaces de opsonizar o atacar directamente a los patógenos invasores (Rainard & Riollot 2006). La inmunidad innata no genera memoria; es decir, no produce respuesta aumentada por exposición repetida al mismo patógeno. Pese a ser activada en conjunto con la respuesta innata, la inmunidad adaptativa constituye una segunda línea de defensa frente a la infección y será relevante cuando la inmunidad innata haya sido sobrepasada. A diferencia de la innata, la respuesta adaptativa no reconoce características típicas de patógenos sino que es capaz de diferenciar lo propio de lo no propio. La inmunidad adaptativa genera memoria, es decir, provee una respuesta aumentada frente al encuentro repetido con un antígeno determinado. Es esta la respuesta que se busca aumentar cuando se utilizan vacunas contra patógenos de mastitis. Entre sus elementos efectores celulares de la inmunidad adaptativa se encuentran los linfocitos B y T y los macrófagos, siendo inmunoglobulinas y citoquinas los principales componentes solubles de este tipo de respuesta. Como ya se ha dicho, ambos tipos de inmunidad están estrechamente relacionados y comparten mecanismos efectores y activadores. De hecho la inmunidad

innata es fundamental para que la inmunidad adaptativa se active adecuadamente y ésta a su vez complementa la función de la respuesta innata.

Muchos patógenos de la glándula mamaria bovina han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta de la glándula mamaria a la infección. Entre ellos, se cuentan la producción de cápsula de polisacárido, la adherencia e internalización en las células epiteliales de la mama y la producción de superantígenos.

1.7. Prevención y tratamiento de la mastitis bovina

Hace tres décadas, el control de la mastitis bovina se basaba en la identificación y tratamiento de los casos clínicos. Sin embargo en los últimos 25 años ha ocurrido un cambio de paradigma en este sentido, acompañado por una fuerte concentración de la producción. Este cambio se basa en el redireccionamiento del esfuerzo desde el tratamiento hacia la prevención y se ha visto reflejado en la incorporación a gran escala del programa de 5 puntos para la lucha contra la mastitis. Estos son: 1) desinfección de pezones post ordeño; 2) terapia antibiótica de casos clínicos; 3) control periódico de la máquina de ordeñar, 4) terapia antibiótica de la vaca seca y 5) descarte de animales con infecciones crónicas (Neave *et al.* 1966; Kingwill *et al.* 1970).

El objetivo del control de la mastitis es evitar nuevas infecciones. Sin embargo, eventualmente éstas van a ocurrir y deben ser eliminadas cuanto antes. Existen cuatro formas en que se reduce el número de casos de mastitis en el tambo: la cura espontánea, el tratamiento antibiótico durante la lactancia, la venta de animales crónicamente infectados y el tratamiento antibiótico al secado. El objetivo es eliminar la infección en el cuarto afectado recuperando su producción lechera en el menor tiempo posible, evitar que la infección se propague por el hato, evitar la mortalidad en los casos hiperagudos y mejorar la calidad de vida de los animales.

Se ha observado que ciertas infecciones son refractarias al tratamiento (Hillerton & Berry 2005) y que la mayoría de los casos clínicos y de la leche descartada se debe a un número pequeño de animales que padece infecciones repetidas a lo largo

de la lactancia . En estos casos, la venta para faena de estos animales es la solución más conveniente para reducir el nivel general de infección del hato lechero. Pese a la relativa efectividad de estos métodos, la terapia antibiótica es aún la herramienta más importante para combatir la infección. Ésta se aplica sobre los cuartos clínicamente infectados o positivos para patógenos contagiosos y en los hatos con un alto número de células somáticas. En general, los antibióticos se aplican directamente dentro de la mama a través del pezón aunque en ocasiones se hace necesaria la aplicación por vía sistémica para alcanzar el sitio de infección. En los casos de mastitis hiperaguda (causados frecuentemente por bacterias coliformes) se realiza una terapia de soporte administrando antiinflamatorios y grandes cantidades de fluidos al animal afectado. En algunos casos también se aplican antibióticos. Por otro lado, la mastitis clínica subaguda, que es la forma más frecuente de la mastitis clínica es tratada mediante la inyección intramamaria de antibióticos. Los porcentajes de cura completa son relativamente bajos, cerca del 50 / , y dependen de factores como el patógeno involucrado, la edad de la vaca y el tiempo de enfermedad.

Ya se ha mencionado que la mayoría de las infecciones presentes en un hato lechero son subclínicas, por lo que su control es importante para reducir el nivel general de infección y el RCS del tambo y para lograr que los animales alcancen todo su potencial productivo. En general, se recomienda el tratamiento de casos subclínicos cuando se detecta la presencia de *Streptococcus dysgalactiae* o cuando el RCS a nivel de tanque está por encima de 400.000. Si bien se realiza en ocasiones, el tratamiento antibiótico en cuartos infectados con otros patógenos no es recomendable debido a los bajos porcentajes de curación (Nickerson 2002).

Se ha mencionado que la glándula mamaria bovina es especialmente sensible a las infecciones bacterianas durante los primeros días del secado. Por esto, el tratamiento con antibióticos de todas las vacas al iniciarse este periodo es de gran importancia para reducir los niveles de mastitis en el hato. Además, los animales que se infectan en este período o que paren con infecciones remanentes de la lactancia anterior producirán alrededor de un 30 / menos de leche que un animal sano, lo que significan importantes pérdidas económicas (Nickerson 2002).

El limitado éxito de la terapia antibiótica durante la lactancia, especialmente sobre infecciones por *Staph. aureus* y el riesgo latente de aparición de cepas bacterianas resistentes, ha promovido el desarrollo de estrategias alternativas para la lucha contra la mastitis. La mayoría de estas técnicas se basan en el incremento de la capacidad inmunológica de la glándula mamaria.

El aumento de la inmunidad específica mediante protocolos de vacunación viene siendo evaluado desde hace varios años con la esperanza de evitar nuevas infecciones, curar infecciones crónicas y disminuir la frecuencia e intensidad de los casos clínicos. Numerosas vacunas se han ensayado, aunque con efectividad variable, contra diferentes antígenos de *Staph. aureus*, como proteína A, antígeno capsular o la bacteria completa crecida *in vitro* (Giraudó *et al.* 1997). Interesantes avances se han realizado también en la inmunización contra bacterias Gram negativas. La inmunización con la vacuna de core J5, una mutante R de *E. coli*, ha mostrado reducir el número y la morbilidad de los casos de mastitis clínica por coliformes (Gonzalez *et al.* 1989).

En los últimos años, se ha obtenido evidencia que apoya el potencial uso terapéutico de algunas citoquinas recombinantes. En tal sentido, se han obtenido resultados alentadores en el tratamiento y prevención de mastitis experimentales por *Staph. aureus* y *E. coli* al administrar factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante humano (rhG-CSF), interleuquina 2 (IL2) e Interferón γ (IFN γ). Estas citoquinas han demostrado también poseer efecto terapéutico al ser administradas en conjunto con antibióticos. Otras moléculas del sistema inmune diferentes de citoquinas como LF y lisozima están también apareciendo como interesantes alternativas al uso de antibióticos para el control de la mastitis bovina (Sordillo *et al.* 1997).

La generación en 1987 de un ratón capaz de producir activador tisular de plasminógeno humano (hTPA) en fluido mamario (Gordon *et al.* 1992) resultó la demostración inequívoca de que era posible modificar la composición de la leche con fines biotecnológicos. El posterior desarrollo de la tecnología de transferencia nuclear en mamíferos domésticos resultó la herramienta complementaria ideal para este

primer desarrollo y actualmente existe una gran cantidad de moléculas de interés comercial que se producen en forma recombinante en leche de cabras y vacas. Rápidamente, estas herramientas comenzaron a ser consideradas para obtener animales resistentes a enfermedades, logro que se obtuvo en 2005 con la generación de una vaca capaz de expresar lisostafina en leche (Wall *et al.* 2005). Esto resultó la prueba de concepto de que era posible mejorar la resistencia a mastitis por medio de tecnología de transgénicos. Posteriormente, van Berkel *et al.* desarrollaron vacas capaces de expresar altas concentraciones de LF en leche (van Berkel *et al.* 2002). Estos animales no presentaron un aumento en la resistencia a la infección experimental con *E. coli* pero sí contra *Staphylococcus chromogenes* (Hyvonen *et al.* 2006; Simojoki *et al.* 2010).

1.8. Importancia de la mastitis

Siendo una enfermedad que afecta al ganado de tambo, es lícito preguntarse cuál es la importancia de la mastitis bovina y, en consecuencia, cuánto esfuerzo en investigación y desarrollo de sistemas de prevención, diagnóstico y tratamiento vale la pena invertir para combatirla.

1.8.1. Importancia económica

La mastitis es una enfermedad eminentemente económica por lo que no se puede entender su importancia sin conocer las pérdidas monetarias que produce. Estas pérdidas derivan de gastos asociados con el control de la enfermedad y en ganancias no obtenidas producto, principalmente, de una disminución en la cantidad y calidad de leche producida.

El mayor impacto económico asociado a la mastitis es la disminución en el volumen de producción. La pérdida de leche para un caso clínico ha sido calculada en un promedio 375 kg totales (Seegers *et al.* 2003), aunque factores como los días en lactancia, el número de parición, el agente etiológico involucrado y el nivel de producción pueden tener una influencia importante en este valor.

La mastitis subclínica tiene también un efecto importante en la producción lechera, sobre todo porque es mucho más prevalente que la mastitis clínica y porque la mayoría de los casos no son tratados. La influencia del RCS ha sido determinada en 0,5 kg por cada duplicación de RCS a partir de las 50.000 células/mL (Hortet & Seegers 1998). Nuevamente, para esta variable se ha encontrado influencia del número y estado de lactancia.

El patógeno involucrado parece también tener influencia en la manera en que el RCS afecta a la producción de leche. Sin embargo, no se ha podido discernir si es el patógeno en sí o la magnitud de la infección lo que produce esta diferencia.

Con respecto a la calidad de la leche, se ha reportado que tanto la mastitis clínica como subclínica tienen una influencia negativa sobre la concentración de proteínas, principalmente caseína, y grasas en la leche bovina (Seegers *et al.* 2003). Por otro lado, el incremento en el RCS del rodeo, producto de la mastitis subclínica, produce, en algunos sistemas de pago, la aplicación de penalizaciones sobre el valor de la leche.

Además del impacto económico de la mastitis producido por disminución de los ingresos, existen gastos directos asociados a su control. Entre ellos cabe destacar el costo de los medicamentos, los honorarios de los servicios veterinarios y el trabajo extra en el tambo. De esta manera, el impacto económico total asociado a la mastitis surge de sumar los beneficios no obtenidos a los gastos adicionales. Se calcula que en EEUU las pérdidas económicas totales producto de la mastitis ascienden a 200 dólares por vaca por año. En el Reino Unido, por otro lado, se ha estimado que el volumen total de pérdidas anuales asociados a la mastitis clínica asciende a £168 millones. Con respecto a la Argentina, y como ya se ha mencionado, no existen estadísticas recientes con respecto a las pérdidas asociadas a la mastitis aunque una estimación de 1983 arrojaba un valor de 220 millones de dólares al año

1.8.2 Salud humana

Además del impacto económico que tiene la mastitis sobre la producción lechera, existe cierto grado de preocupación por la dispersión de zoonosis a través del consumo de leche y sus derivados. Un proceso de pasteurización deficiente o la falta del mismo en algunos sistemas productivos rudimentarios pueden producir la propagación de enfermedades a través del consumo de leche. Estas pueden ser producidas por patógenos que también son causantes de mastitis como *Staph. aureus* y *Strep. agalactiae* o por microorganismos no asociados a esta enfermedad, pero que son capaces de colonizar la glándula mamaria como *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* sp. o *Listeria monocytogenes* (Wells *et al.* 1998). Aún en sistemas donde la pasteurización está garantizada, el público consumidor exige que la leche provenga de vacas sanas.

Existe una creciente preocupación de que el uso sistemático de antibióticos para el control de la mastitis pueda promover la fijación y dispersión de genes de resistencia a antibióticos. Y en particular, de que esta dispersión se produzca en forma horizontal hacia patógenos humanos. De esta manera, los tambos y sus efluentes corren el riesgo de convertirse en sumideros de resistencia a antibióticos. Sin embargo, no existe evidencia clara que muestre un incremento de la prevalencia de estas resistencias a lo largo del tiempo (Erskine *et al.* 2004). Además, estudios que comparan tambos orgánicos que no utilizan antibióticos en ninguna fase del ciclo de lactancia con tambos normales que aplican antibióticos para el control y prevención de las infecciones, no muestran diferencias importantes en la frecuencia de microorganismos resistentes (Pol & Ruegg 2007; Ruegg 2009). Al parecer, el uso de antibióticos en concentraciones letales, propio del tratamiento de la mastitis, no estaría induciendo la fijación de resistencia en las cepas bacterianas. Por el contrario, es la utilización de concentraciones bajas de antibióticos utilizado como inductor de crecimiento lo que podría ocasionar la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Pese a esto, la propagación de resistencias a antibióticos entre especies bacterianas y la posible aparición de microorganismos multirresistentes son riesgos ciertos asociados al uso extensivo de antibióticos en el tambo. Además, el tratamiento

de infecciones de la glándula mamaria es la razón más frecuente para la aparición de residuos de antibióticos en leche con sus consecuencias negativas para la salud humana. Por lo tanto, el desarrollo de métodos alternativos para el control de la mastitis bovina aparece como una necesidad cada vez más urgente.

1.8.3. Bienestar animal

Por último, el bienestar animal es una cuestión que no puede ser ignorada y que recientemente ha ganado mucho interés en el público consumidor. Es evidente que la mastitis hiperaguda es altamente dolorosa y estresante para los animales (Kemp *et al.* 2008). Además se han demostrado cuadros de hiperalgia secundaria luego de casos de mastitis leve (Fitzpatrick *et al.* 1998).

1.9. Mastitis en vacas de primera lactancia

La práctica de manejo sanitario en vacas primíparas se ha basado tradicionalmente en el control de enfermedades no asociadas con la glándula mamaria y la apropiada alimentación y alojamiento. La mastitis, por otro lado, ha sido dejada de lado y, típicamente, un cuarto mamario de una vaca previo a su primera parición era considerado como sano ya que no había sido sometido al estrés ni a la propagación de patógenos contagiosos característicos del ordeño diario.

Sin embargo, en lo últimos años numerosos trabajos han demostrado la existencia de infecciones intramamarias en vacas en primera gestación causadas por los mismos patógenos que en vacas pluríparas (Fox 2009). Notablemente, se ha observado una alta prevalencia de infecciones en vacas, previo al primer parto, la cual suele disminuir durante los primeros días de lactancia. Los principales agentes patógenos involucrados son los ECN y *Staph. aureus* (Trinidad *et al.* 1990). La presencia de infecciones pre-parto en vaquillonas se ha visto asociada con un aumento en el riesgo de futuras infecciones y una disminución en la producción durante la lactancia subsiguiente (Oliver *et al.* 2003). Además, en los casos positivos para *Staph. aureus*, se produce un significativo daño tisular, caracterizado por altos niveles de fibrosis,

leucosis y disminución del tejido alveolar (Zhao & Lacasse 2008; Nickerson *et al.* 1995). Dado que la mayor diferenciación y desarrollo tisular de la glándula mamaria ocurre durante la primera gestación, las infecciones durante este periodo pueden tener un efecto deletéreo para toda la vida productiva del animal.

Es esperable que la epidemiología de la mastitis en vaquillonas sea distinta a la de las vacas. Como ya se ha mencionado, a diferencia de la vacas pluríparas, las vaquillonas no han sido expuestas a ordeño diario con el consecuente riesgo de lesiones en los pezones e infección con patógenos contagiosos. Además, la flora bacteriana de las vaquillonas, no ha sido nunca sometida a la presión selectiva asociada a la terapia de vaca seca y al tratamiento de eventuales infecciones.

Por otro lado, se han registrado diferencias en la capacidad oxidativa de los neutrófilos entre vacas de primera lactancia y vacas pluríparas (Mehrzaad *et al.* 2002). Como aparente consecuencia de estas diferencias, se ha observado que en general la mastitis subclínica es menos frecuente en vaquillonas que en vacas (Fox 2009) aunque las primeras presentan mayor prevalencia de casos clínicos (Barkema *et al.* 1998).

Las vaquillonas representan el futuro lechero y reproductivo de un tambo. Por lo que la salud de la ubre y el bienestar animal durante esta primera lactancia es fundamental para el completo desarrollo de la capacidad productiva de estos animales durante toda su vida en el tambo.

1.10. Lactoferrina

En el apartado 1.6 de esta tesis se mencionó a la LF como uno de los factores solubles de la inmunidad de la glándula mamaria bovina. La LF fue hallada primeramente en la leche humana, para ser encontrada luego en la de otros animales y posteriormente en gránulos de neutrófilos y en todo tipo de fluidos barrera como lágrimas, saliva, secreción intestinal y fluido vaginal.

1.10.1 Estructura de lactoferrina

Estructuralmente, la LF es una glicoproteína de 80 kDa formada por una cadena polipeptídica simple de 700 aminoácidos plegada en una estructura terciaria bilobular (figura 1.4). Estos dos dominios, denominados lóbulo N y el lóbulo C, poseen un alto grado de homología entre sí, lo que sugiere que se han formado por un evento de duplicación génica. Cada uno de los dominios de LF es capaz de coordinar un átomo de Fe^{++} entre residuos Asp, Tyr e His, unión que es favorecida por la presencia de bicarbonato (figura 1.4). Además, se ha demostrado que LF puede unir Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} en el mismo sitio que el hierro. La unión de estos metales al core de cada lóbulo de LF determina el pasaje de un estado rígido de la molécula a uno relajado, lo que aparentemente tiene influencia en sus actividades biológicas (Baker & Baker 2009).

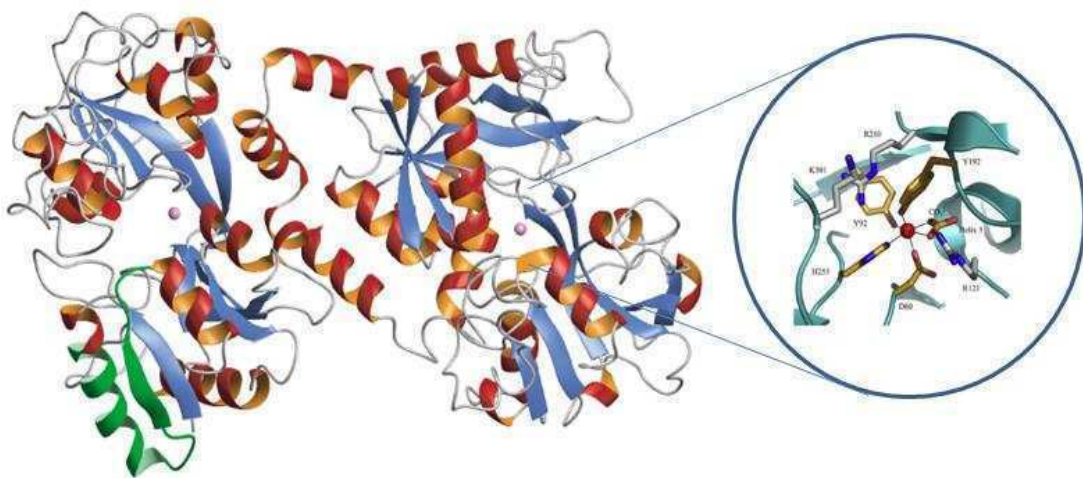


Figura 1.4. Diagrama de cintas de la estructura de LF. Se muestra un detalle de la región de unión al Fe^{++} .

Se han reportado 5 sitios de N glicosilación en la LF, que se encuentran; en Asn-233, Asn-281, Asn-368, Asn-476 y Asn-545. No existe hasta el momento evidencia que

indique que estas glicosilaciones tengan alguna influencia sobre la actividad antimicrobiana de LF, aunque se ha demostrado que la presencia de estos azúcares colaboraría con la estabilidad de la proteína (van Berkel *et al.* 1995). Se ha propuesto también que estos azúcares podrían estar participando en la actividad antiviral de LF (Baker & Baker 2009). Debido a la abundancia de aminoácidos básicos en su extremo amino terminal la LF tiene un punto isoeléctrico (PI) alto (8,5) lo que la diferencia de otros miembros de la misma familia, las transferrinas, con puntos isoeléctricos ácidos, alrededor de 5.5.

1.10.2 Funciones y actividades de lactoferrina

Dada su capacidad de coordinar dos átomos de Fe^{++} la LF fue considerada inicialmente un transportador de Fe^{++} y es posible que ésta sea una de sus funciones fisiológicas. De hecho, la LF presenta homología con la familia de las transferrinas. Sin embargo, estudios tempranos demostraron actividad antimicrobiana LF (Bullen *et al.* 1972), lo cual sumado a su presencia en gran cantidad de fluidos barrera de diversas especies, indicaba una posible función de la inmunidad innata. Hoy en día se han encontrado una enorme cantidad de microorganismos patógenos sensibles a LF *in vitro* (Jenssen & Hancock 2009) y se han ensayado múltiples aplicaciones tecnológicas para esta proteína (Tomita *et al.* 2009).

Clásicamente se entiende que la LF es capaz de inhibir el crecimiento microbiano mediante el secuestro de Fe^{++} . Este elemento es fundamental para el desarrollo de muchos microorganismos y en general es escaso en los fluidos biológicos donde éstos deben subsistir y reproducirse. Sin embargo, diferentes líneas de evidencia indican que LF puede ejercer un efecto bacteriostático y bactericida, independientemente del secuestro del Fe^{++} (Arnold *et al.* 1982). Todavía existe cierto grado de controversia acerca de si esto es realmente posible y de cómo ocurre, aunque lo más factible es que algunos dominios anfipáticos y fuertemente catiónicos interaccionen con la membrana interna de bacterias Gram positivos o con LPS en la membrana externa de Gram negativos (Jenssen & Hancock 2009). En este sentido, se

ha demostrado que LF produce liberación de LPS de *E. coli* y que es capaz de unirse a esta molécula una vez liberada (Ellison, III *et al.* 1988; Ellass-Rochard *et al.* 1995). La capacidad de la LF de desestabilizar la membrana de las procariontas incrementa la sensibilidad de muchos microorganismos a otras moléculas que pueden estar naturalmente presentes, como lizosima o inmunoglobulinas (Spik *et al.* 1978; Ellison, III & Giehl 1991), o adicionados con fines terapéuticos como es el caso de algunos antibióticos (Lacasse *et al.* 2007) o bacteriófagos (Zimecki *et al.* 2008). Además de este efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento y viabilidad de muchos microorganismos, la LF es capaz de antagonizar la infección bacteriana mediante otros mecanismos que incluyen la degradación del sistema de secreción tipo III de *E. coli* (Ochoa & Clearly 2004) y la inhibición de la formación de biofilms en *Pseudomonas aeruginosa* (Singh *et al.* 2002).

Otros microorganismos patógenos, sin embargo, se han adaptado a la presencia de LF en sus nichos de infección y son capaces de utilizarla como fuente de Fe^{++} o como proteína adaptadora para la invasión de células epiteliales (Fang *et al.* 2000).

Además de las funciones mencionadas, la LF ha sido descrita con actividades inmunomoduladoras (Actor *et al.* 2009) y antitumorales (Bezault *et al.* 1994). Estas dos últimas dependen aparentemente de la unión de LF a receptores de membrana (Suzuki *et al.* 2005) y a su capacidad de penetrar en células eucariotas, translocar al núcleo y regular la transcripción de genes específicos (Kanyshkova *et al.* 1999; Mariller *et al.* 2007). Dentro de la glándula mamaria, la LF ha sido propuesta como un modulador de la remodelación tisular durante la lactogénesis y la involución (Baumrucker *et al.* 2003). Por último, se ha demostrado que la LF posee actividad antiviral (van der Strate *et al.* 2001), antifúngica (Takakura *et al.* 2004) y antiameboidea (Leon-Sicairos *et al.* 2006) y que es capaz de inducir la replicación y sobrevivencia de microorganismos de la flora comensal del intestino de los mamíferos como *Bifidobacterium bifidum* (Kim *et al.* 2004).

1.10.3. Lactoferrina en la mastitis bovina

La lactoferrina se encuentra presente en la leche bovina. De hecho, fue en este fluido donde fue hallada por primera vez por Sørensen y Sørensen (1939). Dada la reconocida función antimicrobiana de la LF, resultó claro desde un comienzo la potencial relevancia de esta proteína en la inmunidad de la glándula mamaria bovina.

Numerosas especies causantes de mastitis han demostrado ser sensibles a LF. Sin embargo, existe información divergente con respecto a la potencia y el espectro de acción de la LF y se han encontrado diferencias en la sensibilidad a LF entre aislamientos de una misma especie (Lee *et al.* 2004; Dionysius *et al.* 1993). También se han hallado diferencias en cuanto al tipo de inhibición ejercida. La lactoferrina presenta actividad bactericida sobre algunas cepas de *E. coli* y *Staph. aureus* mientras que parece ser bacteriostática sobre otras (Dionysius *et al.* 1993; Rainard 1986). De la misma manera, el grado de saturación de hierro ha demostrado tener influencia en algunos modelos experimentales y aislamientos bacterianos o ser completamente irrelevante en otros (Dionysius *et al.* 1993; Nonnecke & Smith 1984). Esta heterogeneidad en la sensibilidad a LF pone de manifiesto la necesidad de abordar el estudio de esta proteína desde una perspectiva regional, particularmente a la hora de evaluar su potencial uso diagnóstico y terapéutico.

La concentración de LF en el fluido mamario bovino es altamente variable. Factores como el número de lactancia, los días en leche y la raza del animal así como el estatus sanitario de la mama parecen tener influencia en la concentración de LF en la leche bovina (Cheng *et al.* 2008). Por otro lado, estudios recientes han demostrado el carácter heredable de la concentración de LF (Arnould *et al.* 2009), lo cual abre el camino de la cruce selectiva para aumentar los niveles de esta proteína en el rodeo y mejorar la sanidad y calidad nutricional de la leche producida.

Dentro de los factores mencionados, los que parecen tener mayor impacto en la concentración de LF en leche son el estado lactacional y el estatus sanitario. Con respecto al primero, los niveles de LF son relativamente bajos durante la lactancia, alrededor de 20 µg/mL, aunque suelen incrementarse hacia el final de la misma. Este

aumento se hace más abrupto durante las primeras semanas de secado, pudiendo alcanzar concentraciones de 20 mg/mL (Welty *et al.* 1976). Al aproximarse el parto, la concentración de LF vuelve a descender rápidamente y se hace mínima alrededor del día 60 de lactancia.

Con respecto al estatus sanitario, se ha reportado que la concentración de LF puede subir hasta 30 veces durante una infección clínica (Harmon *et al.* 1975). Se ha descrito también un aumento de los niveles de LF en infecciones subclínicas (Hagiwara *et al.* 2003), aunque la información en este sentido es mucho más escasa. Además ha sido demostrado que la concentración de LF correlaciona positivamente con el RCS (Cheng *et al.* 2008). En el fluido mamario, la lactoferrina puede encontrarse en los gránulos secundarios de neutrófilos o ser secretada por las células epiteliales de la glándula. Si bien durante la infección se produce una llegada masiva de neutrófilos desde el torrente sanguíneo que podrían justificar el incremento de LF observado, Harmond *et al.* (1980) han aportado evidencia de que la secreción por parte de la glándula mamaria jugaría un papel preponderante en este incremento. Otros autores han reportado el aumento de la expresión *in vitro* de LF al tratar cultivos celulares con suspensiones bacterianas (Wellnitz & Kerr 2004).

Parece claro que la LF juega un papel preponderante en la defensa de la glándula mamaria contra infecciones. Sin embargo, no está bien determinado el papel que desempeña cada especie bacteriana en el incremento de LF durante la infección. Además, dados los cambios fisiológicos que se producen en la glándula mamaria durante la lactancia, se abre la pregunta de si el incremento de los niveles de LF está influenciado por el estado fisiológico de la mama.

Teniendo en cuenta la capacidad de LF de inhibir el crecimiento *in vitro* de patógenos causantes de mastitis es que se la ha considerada como herramienta complementaria o alternativa al uso de antibióticos para el control de la mastitis bovina (Kutila *et al.* 2004; Kai *et al.* 2002; Petitclerc *et al.* 2007). Ya se ha mencionado que existe una creciente preocupación por la aparición de residuos de antibióticos en leche. Este problema no existiría con el uso terapéutico de LF dadas sus probadas

cualidades nutracéuticas (Vogel *et al.* 2002). La presencia exógena de LF en la leche sería una buena noticia y no una mala.

1.10.4. Péptidos derivados de lactoferrina

En 1991, y durante estudios sobre la pasteurización de LF a pH ácido, se descubrió que un hidrolizado ácido de LF poseía una actividad específica superior a la de la proteína intacta (Saito *et al.* 1991). Posteriormente, el mismo grupo generó péptidos con similar actividad biológica mediante la hidrólisis de LF con pepsina (Tomita *et al.* 1991), lo que además poseía sentido biológico, ya que la pepsina es una proteína presente en el intestino de los mamíferos. Este grupo aisló y caracterizó al péptido responsable de esta actividad al que patentó con el nombre de lactoferricina (LFcin) y que correspondía a los aminoácidos 17-41 de la LF original. Este péptido posee una estructura primaria rica en Trp y Arg dispuestos en una estructura anfipática de dos hojas beta unidas en sus extremos por un puente disulfuro, estructura que es similar a la de otros péptidos con actividad antimicrobiana hallados en la naturaleza (Powers & Hancock 2003). Se ha demostrado que LFcin posee actividad bactericida *in vitro* contra *E. coli*. El mecanismo de acción de LFcin no está del todo establecido pero se ha observado que esta molécula es capaz de despolarizar membranas biológicas y penetrar en el citoplasma bacteriano (Vogel *et al.* 2002; Aguilera *et al.* 1999), aunque no se ha reportado que posea capacidad bacteriolítica.

Actualmente se considera que la actividad antimicrobiana independiente de Fe⁺⁺ de la LF es ejercida por su extremo amino terminal donde se encuentra el péptido LFcin. Sin embargo, la estructura secundaria de esta región en la proteína intacta no es una doble hoja beta como se ha descrito para LFcin, sino una alfa hélice, y es difícil pensar que dos estructuras tan disímiles posean exactamente el mismo mecanismo de actividad biológica (Vogel *et al.* 2002). Se ha demostrado que la liberación de LFcin es posible en el tracto digestivo de los mamíferos (Kuwata *et al.* 1998), lo que posibilitaría una función de este péptido en la transferencia pasiva de inmunidad durante el amamantamiento.

Además de LFcin, se ha reportado la existencia de otro péptido con propiedades antimicrobianas dentro de la secuencia de LF. Este péptido denominado lactoferrampina (LFampin) comprende los aminoácidos 268-284 de LF y se encuentra espacialmente próximo a la región que comprende a LFcin (van der Kraan *et al.* 2004). Al igual que este último, LFampin es un péptido catiónico y anfipático y posee una actividad específica superior a la de LF. Pese a que no es probable que LFampin sea liberado en condiciones fisiológicas, su proximidad estructural a LFcin sugiere que podría estar involucrado en la interacción de LF con membranas biológicas.

1.11. β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina (β -LG) es la principal proteína del suero de los rumiantes (2 a 3 g/L) y está presente en una amplia variedad de mamíferos aunque notablemente no se la encuentra en humanos y lagomorfos. Es un miembro de la superfamilia de las lipocalinas dado que presenta la estructura típica de este grupo, un arreglo de ocho hojas β en forma de barril que determina un *calix* fuertemente hidrofóbico (Sawyer & Kontopidis 2000). La β -LG es una proteína catiónica con un PI de alrededor de 5 y un peso molecular de aproximadamente 18.000 Da. En condiciones fisiológica β -LG existe en forma de dímero. Se han reportado diferentes variantes alélicas de β -LG siendo β -LG A y β -LG B las más frecuentes entre las razas de vacas lecheras. La variante B de β -LG difiere de la A en dos aminoácidos (Asp 64 por Gly y Val 118 por Ala) y ha sido asociada a diferencias en los niveles proteicos en leche y en algunas características de su procesamiento industrial (Qin *et al.* 1999; Heck *et al.* 2009; Bovenhuis *et al.* 1992).

Pese a ser una proteína profundamente estudiada, la función de β -LG es todavía materia de debate. En base a su homología con la familia de las lipocalinas se ha propuesto una función de transporte para β -LG (Kontopidis *et al.* 2004). Esta hipótesis ha sido apoyada por experimentos de binding y análisis estructurales que muestran que β -LG es capaz de unir moléculas hidrofóbicas como retinol, colesterol y ácidos grasos, siendo probablemente este último el ligando endógeno de la molécula (Perez & Calvo 1995). También, se ha propuesto que β -LG podría tener una función en la

digestión de lípidos estimulando la actividad de la lipasa faríngea (Perez *et al.* 1992). Algunas funciones inmunes han sido también atribuidas a β -LG. Ouwehand *et al.* (1997) probaron que β -LG es capaz de inhibir la adhesión bacteriana a ciertas proteínas intestinales. Por otro lado, Pellegrini *et al.* (2001) demostraron que péptidos derivados de la digestión de β -LG con tripsina poseían actividad antimicrobiana. Ambos hallazgos estarían asociando a β -LG con una función en la transferencia pasiva de inmunidad de madre a cría durante los primeros días de amamantamiento. Pese a estos esfuerzos por encontrar una función biológica para β -LG ninguna de estas hipótesis explica satisfactoriamente la enorme cantidad de esta proteína en leche.

1.12. Objetivos

1.12.1. Objetivo general

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la introducción de esta tesis queda claro que la LF podría jugar un rol fundamental en la defensa de la glándula mamaria contra infecciones. Sin embargo, no se ha determinado el papel exacto de esta proteína en infecciones subclínicas ni se conocen del todo su relación con el patógeno particular involucrado y el momento de la lactancia.

Por otro lado, la función de otras proteínas de la glándula mamaria como la β -LG no está del todo determinada pese a su abundancia y al enorme volumen de investigación científica que se le ha dedicado.

Por último, dado la importancia económica y sanitaria de la mastitis bovina y la creciente tendencia hacia el uso de tecnología de punta en el tambo, es que se vuelve necesario el desarrollo de tecnologías innovadoras para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la mastitis bovina.

En función de estos conceptos, el objetivo general de esta tesis es estudiar el papel de LF y otros elementos solubles en la defensa de la glándula mamaria y su potencial aplicación para la lucha contra la mastitis.

1.12.2 Objetivos Particulares

En función del objetivo general antes señalado se plantearon los siguientes objetivos particulares que serán abordados en 4 apartados independientes de resultados.

- I. Estudiar la relación entre los niveles de LF en cuartos de vacas pluríparas infectadas con distintos agentes patógenos y la sensibilidad de esos patógenos a LF *in vitro*.
- II. Analizar los cambios en la concentración de LF durante las infecciones, evaluadas tanto por análisis microbiológicos como por parámetros inflamatorios, en vacas de primera lactancia y relacionar esos cambios con el estado lactacional del animal.
- III. Analizar el potencial diagnóstico y predictivo de LF sobre eventos de infección intramamaria.
- IV. Estudiar el posible rol de β -LG en la defensa de la glándula mamaria bovina.
- V. Estudiar los péptidos antimicrobianos derivados de LF y evaluar su expresión recombinante en proteínas de fusión como posible estrategia para generar ganado bovino resistente a mastitis.

2. Materiales y Métodos

2.1 Recolección de muestras y aislamientos microbiológicos

2.1.1. Vacas pluríparas

Muestras de leche de 305 cuartos individuales de ubre bovina de 5 tambos diferentes fueron utilizadas en esta parte del estudio. Las mismas fueron tomadas sin tener en cuenta la edad de la vaca, el número de lactancia o el estado lactacional. Las muestras de leche fueron tomadas en forma aséptica inmediatamente después del despunte y mantenidas a 4 °C hasta ser cultivadas. Cuando las muestras no pudieron ser procesadas dentro de las 24 h post-recolección se procedió a congelarlas a -20 °C. El cultivo microbiológico se realizó sembrando 50 µL de muestra en agar esculina-sangre e incubando por 24-48 h a 37 °C. Simultáneamente y para recuperar patógenos presentes en baja concentración, una alícuota de cada muestra fue preincubada 4 h a 37 °C y luego sembrada en agar esculina-sangre. El aislamiento y reconocimiento de los diferentes microorganismos fue realizado de acuerdo con las recomendaciones del National Mastitis Council, Inc (Hogan *et al.* 1999). Los cuartos con mastitis clínica fueron definidos como aquellos que presentan signos evidentes de infección (hinchazón, enrojecimiento, dolor en la ubre, grumos en leche) los cuales fueron determinados por el personal del tambo. Un cuarto microbiológicamente positivo fue definido como aquel positivo para el aislamiento de una o dos especies bacterianas patógenas de una muestra de leche de cuarto. Las muestras que presentaron tres o más especies en la placa fueron consideradas contaminadas y no fueron utilizadas para el estudio. En esta fase del estudio no se contó con información referida al RCS del cuarto en estudio por lo que las inferencias sobre el estatus sanitario de cuartos sin signos clínicos se basaron exclusivamente en la información microbiológica. Luego de este análisis se determinó la concentración de LF en cada muestra por ELISA de competencia como se detalla más abajo.

2.1.2. Vacas primíparas

Para el análisis en vacas primíparas (ver apartado 3.2) se realizó un estudio de cohorte. Ochenta vacas de primera lactancia fueron seguidas desde el parto hasta el secado o hasta que fueron retiradas del tambo por otras razones. Una vez al mes, se tomaron muestras de leche de cuartos individuales de cada vaca (de forma similar a la utilizada para vacas pluríparas) y se realizaron análisis microbiológicos, recuento de células somáticas y cuantificación de LF. El análisis microbiológico se realizó como se detalla más arriba. El recuento de células somáticas se realizó en la Asociación del Litoral de Entidades de Control Lechero (ALECoL), Esperanza, Santa Fe, en citómetro Somacount 300. La concentración de LF en leche fue determinada por ELISA de competencia como se detalla más abajo.

2.2 Purificación y análisis de lactoferrina bovina

2.2.1. Purificación convencional de lactoferrina.

La lactoferrina bovina fue purificada de leche de vacas pluríparas sanas. La leche fue desgrasada mediante centrifugación a 10.000 x *g* por 20 min a 4 °C. El pH de la leche desgrasada fue ajustado a 4,5 por agregado de HCl y la solución fue agitada por 30 min y centrifugada a 10.000 x *g* a 4 °C por 30 min para separar las caseínas. El suero obtenido fue neutralizado por agregado de 10 N NaOH centrifugado nuevamente a 10.000 x *g* a 4 °C por 30 min y luego filtrado por una membrana de poro 0,45 µm. El suero filtrado fue cargado en una columna de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NY, EEUU) y, luego de un lavado extensivo con 0,3 M NaCl en buffer fosfato a pH 7,0, la LF fue eluida con 0,5 M NaCl en el mismo buffer. La pureza de la LF obtenida fue evaluada por SDS-PAGE teñido con AgNO₃ donde se observó una única banda con idéntica movilidad electroforética (correspondiente a ~ 80 kDa) a un estándar de LF comercial (Sigma Chemical Co, St Luis, MO, EEUU).

2.2.2. Purificación en batch de LF.

Algunos de los experimentos que se muestran en este trabajo de tesis requieren la utilización de grandes cantidades de LF. En consecuencia, para procesar volúmenes grande de leche se puso a punto un protocolo de purificación en batch. Brevemente, a 4 L de suero de leche desgrasada obtenido como se detalla más arriba se le agregaron 30 mL de una resina de intercambio aniónico SP-Sepharose Fast Flow. Esta mezcla fue incubada a 4 °C con agitación durante toda la noche. Luego de dejarla decantar, la resina fue recuperada, lavada 3 veces con 100 mL de 0,05 M buffer fosfato pH 7,0 y empacada en una columna de vidrio de 2,5 mm de diámetro. La columna así fue lavada extensivamente con 600 mL de buffer fosfato hasta que la DO_{280nm} fue menor de 0,1. La LF adsorbida a la columna fue eluida con 1 M NaCl en 0,05 M buffer fosfato pH 7,0 a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

2.3. Purificación de β -lactoglobulina

La purificación de β -LG fue realizada mediante un protocolo de extracción suave basado en lo descrito por de Jongh *et al.* (2001). Brevemente: se tomó leche bovina de vacas pluríparas sanas y se la conservo en frío hasta ser procesada dentro de las 6 h de recolectada. Quinientos mL de leche fueron centrifugados a 10.000 x *g* por 20 min a 4 °C para delipidación. Esta leche desgrasada fue acidificada a pH 4,5 por adición de 10 N HCL, agitada por 30 min a 4 °C y posteriormente centrifugada a 10.000 x *g* por 30 min a 4 °C para separar las caseínas. Luego de neutralizar por adición de 10 N NaOH, a este suero le fueron agregados 30 mL de una resina de intercambio aniónico DEAE Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NY) en buffer fosfato (pH 7,0). Esta mezcla fue incubada durante toda la noche a 4 °C con agitación constante. Al día siguiente, la resina fue recuperada por decantación, lavada dos veces con 0,1 M buffer fosfato (pH 7,0) y empacada en una columna de vidrio de 2,5 cm de diámetro. Esta columna fue lavada extensivamente con 0,1 M NaCl en buffer fosfato (pH 7,0), y la proteína β -LG fue eluida con 0,25 M NaCl en buffer fosfato (pH 7,0). El eluido fue introducido en una

bolsa de diálisis, concentrado en Aquacide II (Calbiochem, La Jolla, CA), y dializado contra PBS. Esa muestra dializada y concentrada fue sometida a una cromatografía de filtración molecular en una columna Superdex 75 (GE Healthcare, Piscataway, NY) - equilibrada previamente con PBS- y eluida con el mismo buffer. Las fracciones con un volumen de retención correspondiente al dímero de 36 kDa de β -LG de acuerdo con estándares de peso molecular, fueron colectadas. La pureza de la β -LG obtenida fue confirmada por SDS-PAGE teñido con plata cargando 2 μ g de proteína total por calle. La identidad de β -LG fue confirmada mediante la técnica de western blot, cargando 0,1 μ g de proteína por calle. La identificación de los genotipos de β -LG se basó en la movilidad diferencial de las variantes de β -LG al ser resueltas en PAGE 15 / no desnaturizante (Ye *et al.* 2000). El análisis en Tris-tricina SDS-PAGE de la proteína obtenida fue realizado como se ha descrito previamente (Schagger & von Jagow 1987). La pureza e identidad de la β -LG obtenida en este trabajo fue también confirmada mediante HPLC de fase reversa acoplado con espectrometría de masa (RP-HPLC-MS) y análisis de huella dactilar de masa peptídica por MALDI TOF-TOF luego de digestión enzimática. Las masas obtenidas en este último análisis fueron comparadas con la base de datos Swiss Prot usando el software Mascot. Los resultados fueron analizados estadísticamente para obtener la mayor coincidencia. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Proteínas y Péptidos (LANAIS-PRO), (Buenos Aires, Argentina).

2.4. Generación de anticuerpos contra lactoferrina

La lactoferrina cuya preparación se describe más arriba fue utilizada para generar anticuerpos específicos en conejo. Cuatro animales fueron inyectados con 100 μ g de LF en adyuvante de Freund completo y reforzados en tres ocasiones con 100 μ g de LF en adyuvante de Freund incompleto a los 14, 28 y 56 días. El suero hiperinmune fue recuperado 80 días después de la primera inyección. Los procedimientos relacionados con el trabajo con animales fueron aprobados por la comisión de bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, que sigue los lineamientos del

Animal Welfare Act, USDA. El suero de cada conejo fue colectado por separado y el título de anticuerpos determinado por inmunoprecipitación en medio líquido. Anticuerpos anti LF fueron purificados del suero de mayor título mediante una columna de afinidad de LF acoplada a Sepharose. Brevemente: 10 mg de LF en 1 mL de buffer de acople (200 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3) fueron adicionadas a 1 mL de una columna Hi-Trap activada con NHS (GE Healthcare, Piscataway, NY, EEUU e incubados por 1 h a temperatura ambiente. Después de desactivar los grupos activos remanentes, la columna fue lavada con PBS, luego con buffer de elución (100 mM glicina, pH 2,5) y finalmente equilibrada con PBS-T (PBS + 0,05 / v/v Tween 20). El suero diluido al medio en PBS-T fue cargado en la columna y lavado con 0,6 M NaCl en 50 mM buffer fosfato pH 7,0. La elución fue realizada con buffer glicina 100 mM pH 2,5 y se recogieron fracciones de 1 mL en 50 µL de 1,5 M Tris HCL pH 8,6. Se midió la absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas y aquellas de mayor densidad óptica (conteniendo IgG purificada específica contra LF) fueron agrupadas, tituladas y utilizadas posteriormente en los inmunoensayos. La especificidad de los anticuerpos fue evaluada por Western Blot y comparada con la de anticuerpos comerciales anti-LF hechos en cabra obtenidos en Bethyl (Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, TX, EEUU).

2.5. Cuantificación de lactoferrina por ELISA competitivo

Lactoferrina bovina y anticuerpos específicos contra esta proteína, ambos generados en este estudio, fueron utilizados para desarrollar un ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay) competitivo. La lactoferrina bovina, purificada como se describe más arriba fue biotilada con NHS-LC-Biotin (Pierce Chemicals Co, Rockford, IL, EEUU) según instrucciones del fabricante. Se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos de alto pegado (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) con 100 µL/pocillo de una solución de anticuerpo contra LF (3 µg/mL in 200 mM NaHCO₃, pH 8,3) y se incubó toda la noche a 4 °C. El pegado no específico fue bloqueado incubando con una solución de 10 / de suero normal de cabra en TBS-T (solución Tris-buffer-salina con

0,05 / Tween 20, pH 7,5) durante 2 h a temperatura ambiente. Cuatro μL de leche fueron mezclados con TBS-Tween conteniendo 0,15 μg de LF biotinilada en un volumen final de 100 μL . Esta mezcla fue preparada por duplicado y colocada en la placa sensibilizada con anticuerpos anti-LF la cual se incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego, la placa fue lavada e incubada 1 h con una solución de ExtrAvidin-fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co, St Luis, MO, EEUU) en TBS-Tween. Los pocillos fueron lavados con TBS alta sal (TBS-Tween + 0,6 M NaCl, pH 7,5) y posteriormente se generó una reacción colorimétrica por agregado a cada pocillo de 100 μL de una solución de 0,5 / p-nitrofenil fosfato en 100 mM Tris (pH 9,5), 5 mM MgCl_2 . Una curva de calibración fue generada por dilución seriada de una solución de LF de concentración conocida combinada con LF biotinilada en forma similar a lo descrito para las muestras de leche. La reacción colorimétrica fue medida en un lector de microplacas a 405 nm y la curva estándar fue construida por ajuste de la curva de calibración a una ecuación logit de 4 parámetros. La concentración en las muestras fue obtenida por interpolación de los valores de las muestras en la mencionada curva de calibración.

2.6. Infección *in vitro* y análisis de la expresión de lactoferrina

Se aislaron y cultivaron acinos mamarios como ya se ha descrito (Bussmann *et al.* 2004). Las células de glándula mamaria bovina fueron cultivadas en DMEM/F12 con 5% de suero fetal bovino (SFB), suplemento ITS (5 mg/mL insulina, 5 mg/mL transferrina y 0,005 mg/mL selenito de sodio; Invitrogen) a 37 °C en estufa humidificada y bajo una atmosfera de 5% CO_2 . Para los ensayos de infección *in vitro* las células fueron plaqueadas a una densidad aproximada de 25.000 células/ cm^2 e incubadas hasta confluencia en portaobjetos multicámara. Posteriormente se agregó una suspensión de *Strep. uberis* al cultivo celular a una multiplicidad de infección de aproximadamente 1 y se incubó por 3 h, seguido de un lavado con PBS gentamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego de lavar con PBS se agregó DMEM-F12-ITS por 24 h luego de lo cual se realizaron ensayos de inmunocitofluorescencia contra LF.

2.7. Ensayos microbiológicos

2.7.1. Preparación de los inóculos

Las bacterias causantes de mastitis fueron aisladas e identificadas siguiendo los lineamientos del National Mastitis Council, Inc. (Hogan *et al.* 1999). Todos los microorganismos fueron mantenidos en medio Todd Hewitt con 20 / de glicerol a -80 °C y descongelados y sembradas en agar LB (0,5 / extracto de levadura, 1 / cloruro de sodio, 1 / peptona 1,5 / agar-agar) previo a cada experimento. Los inóculos de trabajo de cada aislamiento utilizado fueron preparados por repique de una colonia aislada desde estas placas a caldo LB e incubación por 16 horas. Posteriormente, 0,02 mL de cada precultivo fueron utilizados para inocular 2 mL de caldo LB fresco. Este nuevo cultivo fue incubado por 3 h, diluido en solución fisiológica a una concentración de 4×10^9 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL y utilizado de acuerdo a cada protocolo experimental.

2.7.2. Análisis de actividad antimicrobiana

En este trabajo de tesis se pusieron a punto distintos protocolos para analizar la capacidad antimicrobiana de proteínas y péptidos de leche bovina. La selección de un método u otro respondió principalmente a las necesidades derivadas de las preguntas particulares que se realizaron en cada sección.

2.7.2.1. Evaluación de inhibición de crecimiento en placas de microtitulación

Este método permitió analizar curvas de crecimiento bacteriano por medición de densidad óptica en el mismo pocillo donde crecen las bacterias. En consecuencia, presenta las ventajas de ser relativamente sencillo, de bajo costo y de permitir el análisis simultáneo de un número elevado de condiciones experimentales. Su principal desventaja es que, al medir densidad óptica no es posible analizar la actividad de

antimicrobianos no líticos y que sólo es adecuado con altas concentraciones bacterianas. Brevemente, en una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos se colocan 20 μL de inóculo microbiano preparado como se describe arriba, 60 μL de Medio Antibiótico (0,15 / extracto de carne, 0,15 / extracto de levadura, 0,5 / peptona, 0,1 / dextrosa, 0,35 / NaCl, 0,37 / K_2HPO_4 , 0,13 / KH_2PO_4 ; Difco, Detroit, MI, EEUU) y 20 μL de la solución proteica a evaluar (a la concentración adecuada) o 20 μL de H_2O como control. Las placas de cultivo fueron incubadas en cámara húmeda a 37 °C con agitación. La densidad óptica fue medida cada 2 horas a 590 nm en un lector de ELISA.

2.7.2.2. Evaluación de inhibición del crecimiento en microtubo y recuento en microgota

Este método presenta la ventaja doble de utilizar volúmenes pequeños en la reacción de inhibición (lo que minimiza el uso de proteínas y péptidos aislados durante este estudio) y de emplear un sistema de recuento en microgota (lo que minimiza el tiempo de manipulación y el uso de material de cultivo). Además, el recuento directo de unidades formadoras de colonia permite el estudio de la actividad bactericida de agentes antimicrobianos sean estos líticos o no líticos y posibilita el trabajo con concentraciones pequeñas de microorganismos. Brevemente: en un microtubo de polipropileno de 600 μL se dispensan 4 μL de la suspensión bacteriana preparada como se describe más arriba, 12 μL de Medio Antibiótico y 4 μL de una solución del péptido o la proteína a ensayar a la concentración adecuada o 4 μL de H_2O como control. Esta mezcla fue incubada sin agitación a 37 °C por el tiempo adecuado y posteriormente diluida en forma serial con solución fisiológica. La cantidad de microorganismos viables fue determinada en cada dilución dispensando por triplicado gotas de 50 μL sobre una placa de agar LB. Este tipo de ensayo se realizó de dos formas diferentes: a tiempo fijo, en los casos en los que se deseaba conocer la actividad antimicrobiana general de un compuesto; o en serie temporal cuando era necesario conocer en mayor detalle la cinética de inhibición de las moléculas estudiadas. En este último caso se preparó una serie de tubos idénticos para cada tratamiento sembrando un tubo para cada tiempo evaluado.

2.8. Tipificación molecular de aislamientos de *Streptococcus uberis*

El ADN cromosomal de *Strep. uberis* fue purificado según Wieliczko (2002). El *primer* Ope-4 fue sintetizado en Invitrogen (Carlsbad, CA, EEUU) siendo su secuencia 5' GTGACAGCC 3'. La mezcla de reacción de PCR consistió en 10 mM Tris, pH 8,3; 2,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; 250 μM deoxinucleótidos trifosfato; 0,56 μM *primer* Ope-4, 3,0 unidades of Taq DNA polimerasa. La reacción fue corrida por 45 ciclos en un termociclador Eppendorf usando el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C por 2 min, apareo a 33 °C por 30 s, elongación a 72 °C por 2 min. Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa 2/ y teñidos con bromuro de etidio.

2.9. Análisis de péptidos derivados de lactoferrina

2.9.1. Digestión de lactoferrina con pepsina

Una solución de 6 mL de lactoferrina 115 mg/mL, purificada como se describe arriba, fue llevada a pH 3,0 por adición de HCl y mezclada con 4 mL de una solución 4 mg/mL de pepsina 3300 U/mg (Sigma) en agua también llevada a pH 3,0. Esta mezcla fue incubada a 37 °C con agitación esporádica durante 5 h luego de lo cual la pepsina fue precipitada e inactivada por incubación a 80 °C durante 15 min y centrifugación a 10.000 x *g* por 10 min. La concentración proteica del digerido resultante fue estimada por absorbancia a 280 nm. Este digerido fue utilizado para ensayos de actividad antimicrobiana, ver más arriba; o fraccionado por diálisis doble o cromatografía de intercambio catiónico. Diálisis doble: Aproximadamente 1 mL del mencionado digerido fue introducido en una bolsa de diálisis de 6 mm de diámetro y con un poro de 12.000 de punto de corte. Esta bolsa fue colocada a su vez dentro de una segunda bolsa de 16 mm de diámetro y poro de punto de corte 3.500 con aproximadamente 10 mL de H₂O en su interior. El arreglo de las dos bolsas fue dializado extensivamente contra H₂O desarmado y ambas fracciones (interior de la bolsa pequeña y exterior de la bolsa pequeña) fueron analizadas por separado mediante estudios de inhibición de

crecimiento microbiano y cromatografía de tamiz molecular e intercambio catiónico. Alternativamente, el digerido de LF fue fraccionado por cromatografía preparativa de intercambio catiónico como se detalla a continuación.

2.9.2. Cromatografía de intercambio catiónico

Las cromatografías de intercambio catiónico analíticas y preparativas fueron realizadas en columnas High Trap (GE) de 1 mL y 5 mL de lecho y a una velocidad de flujo 0,2 mL/min y 1 mL/min respectivamente. La columna fue en primer lugar lavada con 10 volúmenes de 0,05 M buffer fosfato a pH 7,0, activada con 10 volúmenes de 1 M NaCl en 0,05 M buffer fosfato a pH 7,0 y finalmente equilibrada con 10 volúmenes de 0,05 M buffer fosfato a pH 7,0. Las muestras proteicas fueron diluidas al quinto en buffer de equilibrio y cargadas en la columna en forma directa o con la ayuda de un “loop” de carga. El percolado fue recuperado y los distintas fracciones eluidas por aplicación de un gradiente en pasos de 0,5 M NaCl y 1 M NaCl en el mismo buffer de equilibrio. Los perfiles de elusión fueron obtenidos por medición en línea de la absorbancia a 280 nm.

2.9.3. Cromatografía de tamiz molecular

En este trabajo de tesis la técnica de cromatografía de tamiz molecular fue realizada con fines preparativos, para aislar β -LG y la proteína de fusión Q7, o analíticos para caracterizar los diferentes fracciones de los productos de digestión de LF. En ambos casos el protocolo utilizado fue esencialmente el mismo. El tipo de columna utilizada también varió de acuerdo a las necesidades particulares de cada ensayo utilizándose alternativamente una columna Superdex 75 o Superdex Peptide (GE Healthcare, Piscataway, NY). La columna utilizada fue equilibrada con PBS y la muestra de interés fue cargada mediante un puerto con destinos loops cuyos volúmenes variaron entre 0,1 mL y 1 mL de acuerdo las necesidades de cada ensayo. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y los perfiles de elusión fueron obtenidos por

lectura en línea de la absorbancia a 280 nm. Para estimar el peso molecular de los picos de absorbancia obtenidos cada ensayo fue precedido por la corrida de proteínas de peso molecular conocido como aprotinina (6.512 Da), insulina reducida (3.400 Da), lisozima (14.000 Da), inhibidor de tripsina de poroto de soja (21.000 Da).

2.10. Análisis de glicosilación

El análisis de la presencia de posibles residuos glicosilados en las fracciones de digestión de LF fue realizado mediante lectinografía y a través del kit comercial Pro-Q® Emerald (Invitrogen). Para el análisis de lectinografía, 0,1 µg de la proteína o péptido a analizar fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante un dispositivo Bio-Dot (Bio-Rad). Luego de ser lavada con PBS-Tween 0,1 / , esta membrana fue bloqueada con 3 / de seroalbúmina bovina (SAB) en PBS-Tween 0,1 / y los distintos pocillos fueron incubados con las correspondientes lectinas acopladas a biotina, diluidas 1/1000 en PBS-Tween 3 / SAB. Se utilizaron las siguientes lectinas: aglutinina de germen de trigo, concanavalina A, aglutinina de *Pisum sativum*, aglutinina de poroto de soja, aglutinina de maní, aglutinina de *Lens culinaris*, eritroaglutinina de *Phaceolus vulgaris*, aglutinina de *Dolichos biflorus*, lectina de *Bandeiraea simplicifolia* y aglutinina de *Ricinus communis*. Luego de la incubación con las lectinas, cada pocillo fue lavado con 250 µL de PBS-Tween, incubado con avidina conjugada a peroxidasa de rabanito, lavado nuevamente con PBS-Tween y revelado con Diaminobenzidina y H₂O₂.

El análisis de glicosilación mediante el kit Pro-Q® Emerald se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, las proteínas de interés fueron resueltas en Bis-Tris-MES-SDS-PAGE. Este gel fue fijado por incubación en 50 / metanol, 5 / ácido acético y lavado en 3 / ácido acético. Los carbohidratos fueron oxidados con una solución 1 / ácido periodico, 3 / ácido acético y el gel fue posteriormente lavado con 3 / ácido acético. Luego, el gel fue incubado por 2 h en la oscuridad con una solución del reactivo Pro-Q® Emerald 300 (previamente diluido en 6 mL de dimetilformamida) diluida 1/50 en el buffer de tinción Pro-Q® Emerald 300 staining buffer. Finalmente, el gel fue lavado en 3 / ácido acético y observado en un transiluminador UV a 280 nm.

2.11. Electroforesis

Diferentes técnicas electroforéticas fueron utilizadas en esta tesis de acuerdo a las necesidades de cada ensayo. Para resolver proteínas de alto o mediano peso molecular se utilizó el protocolo estándar de SDS-PAGE descrito previamente por Leammli *et al.* (1970) con concentraciones de poliacrilamida de entre 10 y 12 %. Para analizar péptidos y proteínas de bajo peso molecular se utilizó el protocolo de Tris-tricina SDS-PAGE descrito previamente por Shagger *et al.* (1987). Para evitar la oxidación de cisteínas y lo consecuente formación de oligómeros de péptidos o aductos entre péptidos y moléculas libres de acrilamida (Hachmann & Amshey 2005) se utilizó la técnica de bis-Tris-MES SDS-PAGE que asegura un medio ácido y reductor durante toda la corrida electroforética. En este tipo de electroforesis el buffer de corrida consistió en 50 mM MES [ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico], 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS y 1 mM bisulfito de sodio. El gel consistió en 0,36 M bis-Tris [Bis(2-hidroxietil)aminotris(hidroximetil)metano] pH 6,5, 15 % poliacrilamida, 0,07 % APS (persulfato de amonio) y 2 µL de TEMED por cada mL de gel (para mayores detalles: http://openwetware.org/wiki/Sauer:bis-Tris_SDS-PAGE,_the_very_best).

2.12. Construcción de vectores y transducción

El gen correspondiente a la proteína de fusión Q7 fue diseñada *in silico* y sintetizado químicamente por la compañía Gen Scrip (Piscataway, NJ, EEUU). Este gen de fusión fue recibido en el plásmido pUC57 con sitios flanqueantes para *Eco* RI. Este vector fue amplificado en bacterias *E. coli* DH5- α , purificado con el kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, EEUU) y digerido con *Eco* RI. El digerido fue corrido en un gel de agarosa y la banda correspondiente al gen *q7* fue extraída usando el kit QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen). En paralelo un procedimiento similar fue utilizado para amplificar, purificar y digerir con *Eco* RI el vector de expresión eucariota pCX-EGFP (Addgene). El fragmento correspondiente al gen *q7* fue ligado al dicho vector río abajo

del promotor de beta actina. La orientación del fragmento fue verificada por digestión con *Pst* I aprovechando la presencia de un sitio para esta enzima de restricción en la base 234 del gen *q7*. El vector pCX con el fragmento *q7* en la orientación correcta (pCXQ7) fue reamplificado en DH5- α , purificado con el quit QIAGEN Plasmid Midi Kit, y utilizado para los experimentos de transfección.

Para los ensayos de transfección, se cultivaron células CHO (chinase hamster ovary) en medio DMEM-F12 con 10% de SFB en presencia de antibióticos hasta un 80% de confluencia en placas de 35 mm de diámetro (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Luego de retirar el medio de cultivo, las células fueron lavadas con PBS e incubadas 2 h en el mismo medio sin antibióticos. En paralelo, la mezcla de transfección fue preparada utilizando dos plásmidos: el vector pCXQ7 utilizado en una relación de 200 ng/cm² de placa cultivada; y el vector pMC1Neo, se utilizó en una relación de 40 ng/cm² de placa. Dos μ g de pCXQ7 y 0,4 μ g de pMC1Neo (volumen final de ambos vectores 6 μ L) fueron incubados con 6 μ L del reactivo PLUS[®] (Invitrogen) en un volumen final de 100 μ L de Optimem (Invitrogen) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente esta mezcla fue combinada con 4 μ L de Lipofectamina[®] (Invitrogen) previamente diluida en 100 μ L de Optimem. Esta mezcla fue incubada por 20 min a temperatura ambiente y colocada sobre las células en un volumen final de Optimem de 1,5 mL. Las células fueron incubadas con esta mezcla de transfección durante 4 h luego de lo cual se agregó SFB a concentración final de 10%. Al día siguiente el medio Optimem fue reemplazado por DMEM-F12 con 10% de SFB. El proceso de selección fue iniciado 48 h después de la transfección mediante el agregado de 0,5 μ g/mL del antibiótico G418 y se prolongó por 7 días. La expresión de la proteína de fusión Q7 fue evaluada por inmunofluorescencia y western blot utilizando anticuerpos específicos contra β -LG.

2.12. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS) versión 15 para Windows.

En todos los casos, un valor de significancia p menor a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

La comparación de la concentración de LF entre cuartos negativos y cuartos positivos para aislamiento microbiano fue realizada mediante una prueba t de Student. El análisis la concentración de LF asociada a los distintos patógenos aislados fue realizado mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un test post hoc de Dunnett donde se comparó el efecto de cada patógeno con los cuartos negativos para aislamiento microbiano. La comparación entre cuartos clínicos e infectados sin signos clínicos fue realizada también mediante una prueba t de Student y el análisis discriminado por patógeno mediante ANOVA de un factor con un test de Dunnett como post test para comparar el efecto de cada patógeno con los cuartos positivos no clínicos. La susceptibilidad *in vitro* de los distintos patógenos a LF fue analizada mediante una prueba t de Student.

El efecto de las distintas variantes de β -LG, LF o β -LG en conjunto con LF, sobre el crecimiento de *Strep. uberis*, *Staph. aureus* y *E. coli* fue evaluado mediante un modelo lineal general donde se incluyó al aislamiento particular de cada patógeno como efecto aleatorio. Para comparar entre el tratamiento con β -LG o LF y la condición control se utilizó ANOVA de un factor con un test de Dunnett como test post hoc. El efecto concentración dependiente de β -LG sobre el crecimiento microbiano fue analizado mediante un análisis de regresión lineal múltiple donde se incorporó a los distintos aislamientos de cada especie como variables de grupo (variables dummy). El análisis se realizó mediante el método de pasos sucesivos (stepwise).

La asociación entre la frecuencia de cuartos infectados y el periodo de lactancia fue analizada mediante un test de χ^2 . La misma prueba fue utilizada para analizar la asociación entre los distintos tipos de infección intramamaria y los días en lactancia.

Con la idea de dar claridad de los resultados, la relación entre la concentración de LF y variables como los días en lactancia, el estatus sanitario, infección clínica, el tiempo anterior y posterior a la infección, y el efecto de los cuartos sanos de vacas con al menos un cuarto infectado (cuartos vecinos) se muestra en gráficos separados. En

éstos se grafica la media \pm el error estándar de la media. Sin embargo, estadísticamente, las relaciones entre estas variables fueron analizadas mediante un modelo lineal mixto que integra todas las variables y las significancias que se muestran en cada gráfico corresponden a los resultados de este modelo. En el mismo, las variables: *intervalos de lactancia*, *estatus sanitario*, *días relativos a la infección*, *cuarto vecino*, *patógeno*, *mastitis clínica* fueron incluidas como efectos fijos. El efecto del muestreo repetido de un mismo cuarto en distintos momentos de la lactancia fue incluido en este modelo mediante la introducción de la variable de sujetos *cuarto y vaca* y el efecto repetido *días en lactancia* asociados mediante un matriz de covarianza autorregresiva (AR1) de acuerdo a lo sugerido por West (2009). El efecto de cada vaca particular en la respuesta a la infección y en el tiempo fue incluido mediante la introducción de la variable *vaca* como efecto aleatorio en el modelo.

El riesgo de contraer infecciones en cuartos con distintos niveles de LF en el periparto fue evaluado mediante diagramas de supervivencia de Kaplan-Meier donde se compararon las curvas de porcentaje de cuartos libres de enfermedad en función del tiempo. Las diferentes curvas fueron analizadas mediante el test de supervivencia Log-Rank.

La capacidad diagnóstica de LF sobre eventos de infección no clínica (determinados por RCS y análisis microbiológico) fue analizada mediante una curva ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic) que grafica (sensibilidad) vs. (100% - / especificidad) de todos los posibles concentraciones de LF usadas como punto de corte para determinar si un cuarto está o no infectado. Como estándar dorado se usó el criterio combinado de la IDF como se describe en el cuadro 1, (ver introducción). El área bajo la curva representa la probabilidad de clasificar correctamente un cuarto infectado. Un valor de 0,5 indica que la clasificación es al azar y por lo tanto que el parámetro evaluado no tiene valor para determinar la ocurrencia de una infección. La diferencia entre el área obtenida y un área de 0,5 (azar) fue evaluado por el test no paramétrico de Wilcoxon.

La relación entre LF y variables asociadas al estatus sanitario general del tambo fue evaluada mediante un análisis de regresión múltiple en pasos sucesivos (stepwise).

Las variables incorporadas fueron *concentración de LF (mg/mL)* como variable independiente y como variables explicativas: *recuento de células somáticas, recuento de bacterias totales en placa, recuento de termodúricas, recuento de coliformes totales, recuento de Streptococcus agalactiae, recuento de Staphylococcus aureus, recuento de Streptococcus spp., y recuento de Staphylococcus spp.*

3. Resultados

3.1. Relación entre la respuesta de lactoferrina a la infección y la sensibilidad a lactoferrina por parte de patógenos causantes de mastitis

Las diferencias regionales relacionadas con el manejo sanitario, el alojamiento de los animales, el tipo de alimentación utilizada y las condiciones ambientales predominantes determinan diferencias en la incidencia, prevalencia y etiología de la infección de la glándula mamaria. Además, como ya se ha mencionado, existe cierta variabilidad entre los distintos aislamientos bacterianos en cuanto a la sensibilidad a la acción antimicrobiana de LF. Es por esto que se hace necesario encarar el estudio del papel de la LF y otros elementos solubles en la defensa contra la mastitis desde una perspectiva local. En consecuencia, para la primer parte de este trabajo se utilizaron cepas bacterianas aisladas de cuartos clínica y subclínicamente infectados de establecimientos lecheros de la provincia de Buenos Aires.

Como primer paso para la realización de este trabajo se purificó LF bovina de leche de tambo como se describió en materiales y métodos. Se tomó ventaja del punto isoeléctrico relativamente alto de esta proteína (8,5) y se utilizó cromatografía de intercambio catiónico. Para esto, fue puesto a punto un sistema que incluía un primer paso en batch y un segundo paso en columna lo que permitió procesar volúmenes grandes de leche en tiempos cortos y a bajo costo. La optimización de este proceso fue un paso fundamental en la realización de este trabajo dada la gran cantidad de LF requerida en algunos de los experimentos realizados. La utilización de LF aislada en nuestro laboratorio tiene la ventaja de poder controlar todos los pasos de la purificación, evitando posibles alteraciones producto del procesamiento industrial.

La pureza de la LF obtenida fue verificada por SDS-PAGE teñido con plata y su identidad confirmada por western blot con anticuerpos comerciales (figura 3.1.1). Esta proteína fue utilizada para generar anticuerpos específicos en conejos. Luego del proceso de inmunización, los sueros obtenidos fueron pasados por columnas de

afinidad acopladas a LF para purificar anticuerpos de alta afinidad. Parte de la LF obtenida fue marcada con biotina tal como se detalla en materiales y métodos. Utilizando los anticuerpos generados y la LF purificada, nativa o acoplada a biotina se puso a punto un protocolo de cuantificación de LF. Dos estrategias diferentes fueron evaluadas: ELISA sándwich y ELISA de competencia. Dada su mayor simplicidad y rapidez el segundo método fue elegido para los subsiguientes análisis.

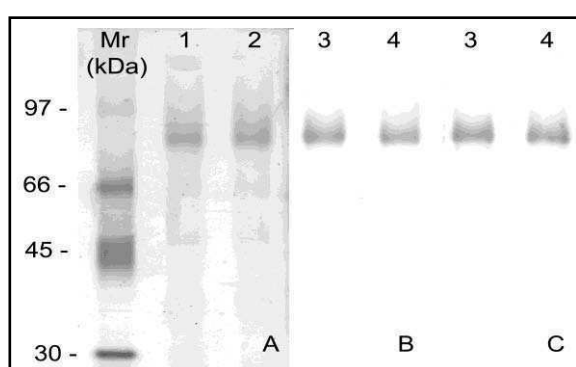


Figura 3.1.1. Purificación de LF y ensayo de anticuerpos específicos. Lactoferrina bovina comercial o purificada en este trabajo fue resuelta en SDS-PAGE 10%. Panel A: Tinción con plata de 0,5 µg de LF comercial (calle 1) o aislada en nuestro laboratorio (calle 2). Panel B: western blot de 0,1 µg de de LF comercial (calle 3) o aislada en nuestro laboratorio (calle 4) revelado con un anticuerpo comercial contra LF. Panel C: western blot de 0,1 µg de de LF comercial (calle 3) o aislada en nuestro laboratorio (calle 4) revelado con el anticuerpo contra LF generado en este trabajo.

Numerosos estudios han reportado que la concentración de LF aumenta cuando se presenta una infección clínica (Harmon *et al.* 1975; Kawai *et al.* 1999) lo cual es consistente con un papel de esta proteína en la inmunidad de la glándula mamaria bovina. Sin embargo la información concerniente a las infecciones subclínicas es más escasa. En función de esto, se analizaron muestras de leche de 261 cuartos mamaros (que no presentaban signos evidentes de inflamación) de vacas Holando Argentinas,

evaluando la presencia de microorganismos patógenos mediante técnicas microbiológicas tradicionales, y la concentración de LF en cada cuarto por ELISA de competencia. En la figura 3.1.2 se observa que la concentración de LF es significativamente mayor en los cuartos positivos para infección que en los que resultaron negativos para este análisis. Esto podría estar indicando que la mama responde a la infección incrementando la concentración de LF aún en ausencia de signos externos de inflamación.

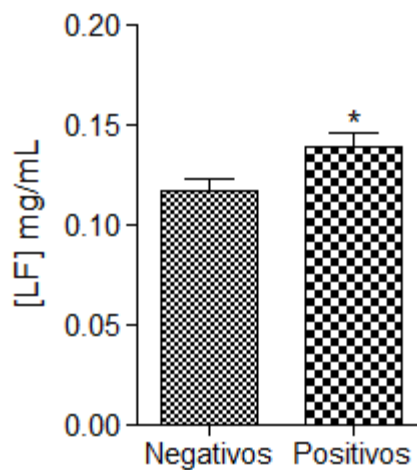


Figura 3.1.2. Lactoferrina y presencia de microorganismos en cuartos no clínicos. Concentración de LF en leche (media ± EEM) de cuartos negativos o positivos para aislamiento microbiano que no presentaban signos visibles de infección. * indica $p < 0,05$.

Diferentes agentes patógenos utilizan distintas estrategias para invadir y establecerse en la glándula mamaria. Es por lo tanto esperable que la respuesta inmune varíe dependiendo del patógeno involucrado en la infección. Con el objetivo de evaluar el cambio en los niveles de LF asociado a cada patógeno individual se analizaron los niveles de LF en cuartos negativos y positivos para distintos microorganismos. En la figura 3.1.3 se muestra que sólo los cuartos infectados con

Strep. uberis presentan un aumento significativo en la concentración de LF. Aparentemente, este patógeno es responsable de la mayoría de la variabilidad entre grupos observada en la figura 3.1.2.

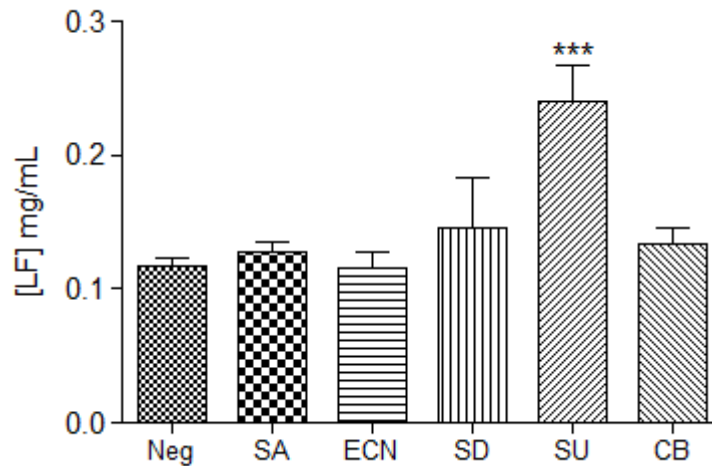


Figura 3.1.3. LF y distintos patógenos en cuartos no clínicos. Concentración de LF (media \pm EEM) en leche de cuartos microbiológicamente negativos (Neg) o cuartos positivos para *Staphylococcus aureus* (SA) Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN), *Streptococcus dysgalactiae*, (SD), *Streptococcus uberis* (SU) y *Corynebacterium bovis* (CB). *** indica $p < 0,001$.

Si la LF es realmente un elemento de la inmunidad innata, es de esperar que al aumentar el grado de respuesta general de la mama aumenten también los niveles de LF. Es decir, la concentración de LF debería aumentar con la inflamación general. Esta idea predice entonces que los cuartos infectados clínicamente deberían presentar mayor concentración de LF que los cuartos subclínicos. Para contrastar esta hipótesis se midió la concentración de LF en 44 cuartos que presentaban signos evidentes de infección (cuartos clínicos). No se hizo distinción entre grados de mastitis clínica. Se observó que, en efecto, los cuartos clínicos presentaban mayores niveles de LF que los cuartos infectados no clínicos (figura 3.1.4) lo que indica que la concentración de LF está acompañando al resto de los signos inflamatorios.

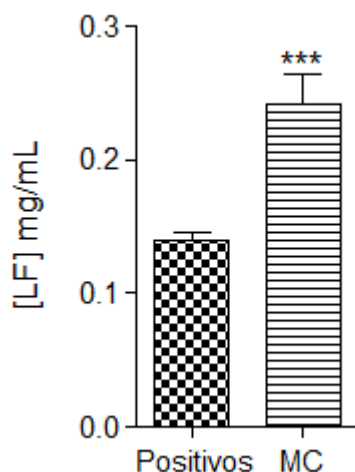


Figura 3.1.4. Lactoferrina en cuartos clínicos. Concentración de LF (media ± EEM) en leche de cuartos mamarios positivos para aislamiento microbiano pero sin signos visibles de inflamación (Positivos) y cuartos clínicamente infectados (MC) *** indica $p < 0,001$.

El análisis discriminado de la contribución relativa de cada patógeno a esta diferencia mostró que sólo los cuartos positivos para *Strep. uberis* y aquellos negativos para aislamiento microbiológico presentaban una mayor concentración de LF que los cuartos positivos para aislamiento microbiológico pero sin signos clínicos (figura 3.1.5).

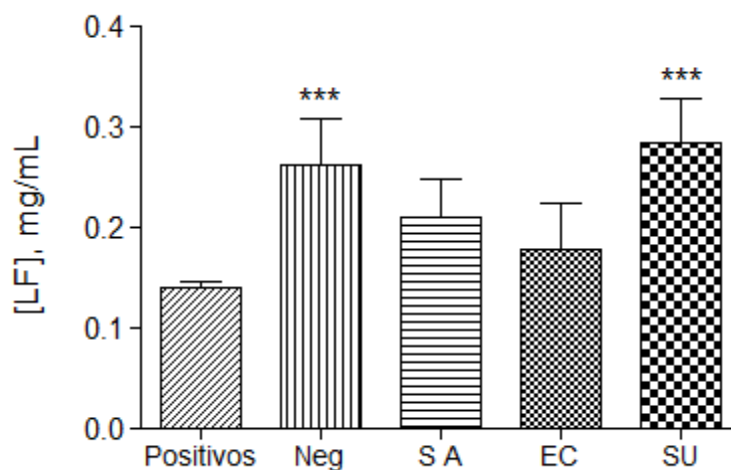


Figura 3.1.5. LF y distintos patógenos en cuartos clínicos. Concentración de LF (media ± EEM) en cuartos mamarios positivos para aislamiento microbiano pero sin signos evidentes de inflamación y cuartos con signos clínicos que no arrojaron aislamiento microbiano (Neg) o que fueron positivos para *Staphylococcus aureus* (SA), *Escherichia coli* (EC) o *Streptococcus uberis* (SU).

Aparentemente, la infección con *Strep. uberis* produce un incremento en la LF en leche. Se han descrito dos fuentes principales de LF en la glándula mamaria bovina: los gránulos secundarios de los neutrófilos que extravasan a la mama durante la infección y las propias células del epitelio glandular de la mama. Existe cierto grado de desacuerdo con respecto a cuál de las dos es la principal fuente de LF en la infección. Una forma de abordar este problema es evaluar si las células epiteliales son capaces de sintetizar LF y si esta síntesis aumenta cuando se las trata con una suspensión de bacterias. En consecuencia, se realizaron experimentos de infección *in vitro* con *Strep. uberis* en cultivos primarios de glándula mamaria bovina. Los ensayos de inmunofluorescencia que se muestran en la figura 3.1.6 indican que aquellas células tratadas con la suspensión bacteriana presentan mayor síntesis de LF que el control no tratado. Este resultado muestra que las células del epitelio glandular de la mama son capaces de sintetizar LF y que esta síntesis se ve incrementada con el tratamiento con *Strep. uberis*.

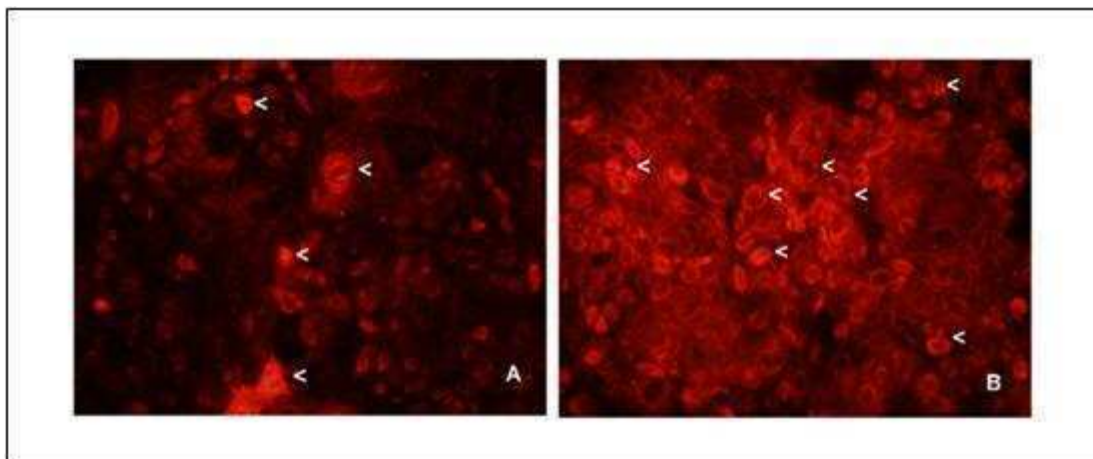


Figura 3.1.6. Expresión de LF *in vitro* en cultivos primarios de células de glándula mamaria Inmunofluorescencia de LF en condiciones control (A) o tratadas con una suspensión de *Streptococcus uberis* (B). Las flechas indican células representativas positivas para la expresión de LF. Aumento: 400 X. El mismo patrón de expresión fue observado en dos experimentos independientes realizados en duplicado.

En la figuras 3.1.2 y 3.1.3 se mostró que las infecciones no clínicas producen un aumento en los niveles de LF, que este aumento parece ser diferente dependiendo del patógeno involucrado y que *Strep. uberis* está asociado a los mayores niveles de LF. Si este es el caso general, cabría esperar que esta especie bacteriana esté adaptada de alguna manera a niveles aumentados de LF; siendo por ejemplo resistente a la acción antimicrobiana de LF. Se decidió entonces analizar si existía algún tipo de relación entre la respuesta de LF de la glándula mamaria y la sensibilidad *in vitro* a esta proteína por distintos patógenos. Para esto se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento *in vitro* con 4 aislamientos de 3 de los principales patógenos de la glándula mamaria bovina *Staph. aureus*, *E. coli* y *Strep. uberis*. Estos 12 aislamientos fueron obtenidos de muestras de leche de tambos locales. En la figura 3.1.7 se muestra que el tratamiento con 2 mg/mL de LF inhibió significativamente el crecimiento de *E. coli* y *Staph. aureus* pero no tuvo efecto sobre *Strep. uberis*. Este resultado sugiere que la especie asociada a mayores niveles de LF en la glándula mamaria es en efecto menos susceptible a la acción antimicrobiana de LF que aquellas que aparentemente no inducían cambios en la expresión de esta proteína.

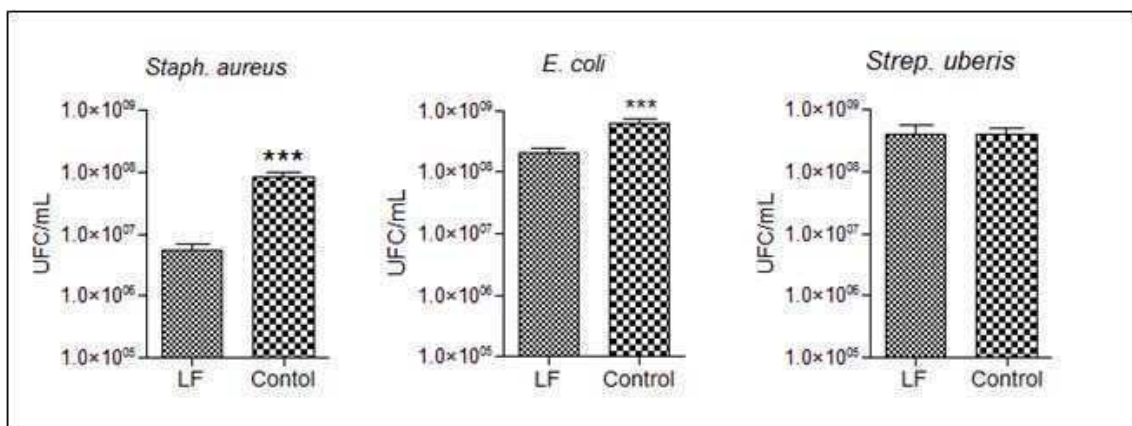


Figura 3.1.7. Actividad inhibitoria del crecimiento de LF contra bacterias causantes de mastitis. Cuatro aislamientos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* obtenidos de cuartos mamarios infectados fueron incubados en presencia (LF) o ausencia (Control) de 2 mg/mL de LF. El número de bacterias fue determinado por recuento en placa luego de 6 horas de cultivo. Cada columna representa la media \pm EEM de los cuatro aislamientos de cada especie ensayados por triplicado. *** $p < 0,001$.

Por último, para descartar que el efecto observado en cuanto a la susceptibilidad a LF se específico de una cepa particular de *Strep. uberis* se realizó un análisis molecular del genotipo de los 4 aislamientos utilizados. La figura 3.1.8 muestra que 3 de los 4 aislamientos utilizados correspondían en efecto a cepas diferentes descartando que la resistencia a LF observada sea un carácter específico de cepa.

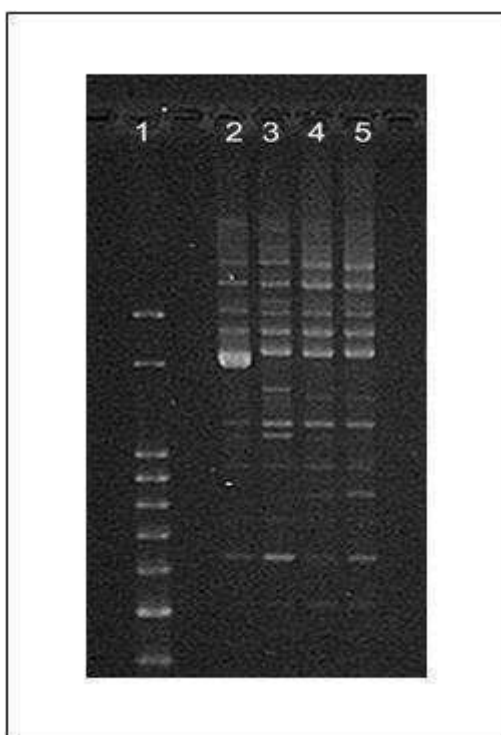


Figura 3.1.8. Fingerprint molecular de los 4 aislamientos de *Streptococcus uberis* utilizados en la figura 3.1.7. ADN de los 4 aislamientos de *Strep. uberis* utilizados en la figura 3.1.7 fue amplificado por PCR con el primer ope4 y resuelto en un gel de agarosa 2 / teñido con bromuro de etidio (calles 2-5). La calle 1 corresponde a un marcador de peso molecular de 100 pb.

3.2. Lactoferrina y mastitis bovina en vacas de primera lactancia

En el apartado 3.1 de esta tesis se demostró que la glándula mamaria bovina es capaz de reaccionar frente a la infección intramamaria mediante el aumento específico de la secreción de LF. Para estos ensayos se utilizaron muestras de leche de vaca tomadas aleatoriamente sin tener en cuenta factores como el número de lactancia los días en lactancia o la existencia de eventos previos de infección clínica o subclínica. Estos factores, pueden afectar a largo plazo variables como la secreción basal de LF la susceptibilidad a futuras enfermedades o la forma e intensidad con que la glándula mamaria responde a una infección.

En consecuencia, el objetivo que se planteo en el presente apartado de esta tesis fue profundizar el análisis del papel que juega la LF en la defensa de la glándula mamaria mediante un estudio dinámico que permita relacionar los eventos que ocurren durante la enfermedad con aquellos previos y posteriores a ella.

Con este objetivo se realizó un estudio de cohorte de lactancia completa sobre 80 vacas de primera parición. La elección de animales primíparos se debió a que éstos presentan características inmunológicas y microbiológicas únicas, ya que no han pasado por el estrés del ordeño o eventos de mastitis clínica y su flora bacteriana no ha sido afectada por terapias de vaca seca. Además, las vacas de primera lactancia son particularmente interesantes dado que constituyen el futuro productivo y reproductivo de un tambo. Los mencionados animales, seleccionados al azar de una hacienda a pastura con niveles medios de RCS, fueron muestreados mensualmente por extracción de leche de los cuatro cuartos. Estas muestras fueron utilizadas para análisis microbiológico y de RCS y para la determinación de los niveles de LF por ELISA de competencia.

En el apartado 3.1 de esta tesis se determinó la presencia de una infección intramamaria en un cuarto por el aislamiento microbiológico positivo de muestras de leche provenientes de ese cuarto. En esta oportunidad, la incorporación del análisis RCS en muestras de cuartos individuales permitió aplicar la escala completa de clasificación de infecciones de la glándula mamaria recomendada por la International

Dairy Fundation y por otros autores (Pyorala 2003). Esta clasificación divide a las infecciones intramamarias en *infecciones latentes* (cuartos microbiológicamente positivos con menos de 200.000 células somáticas por mililitro) *infecciones inespecíficas* (cuartos con RCS igual o mayor a 200.000 y con aislamiento microbiológico negativo) y mastitis subclínica (cuartos positivos microbiológicamente y con células somáticas mayores a 200.000); ver introducción cuadro 1.1.

Del total de las 2964 muestras de cuartos individuales analizadas en este estudio el 1,5 / presentó infecciones clínicas mientras que el 13,2 / resultó positivo para algún tipo de infección intramamaria no clínica (ver introducción cuadro 1.1). De estos cuartos no clínicos el 25 / (3,29 / del total) presentó infecciones latentes, el 62 / (8,17 / del total) infecciones inespecíficas y el 13 / (1,71 / del total) infecciones subclínicas (figura 3.2.1). Esto está indicando que en muchos casos, la entrada de un microorganismo patógeno no produce una reacción inflamatoria y en segundo lugar que en la mayoría de las infecciones intramamarias no es posible detectar la presencia de un patógeno causal aún cuando se sembraron 50 µL de leche en cada placa de detección (ver materiales y métodos).

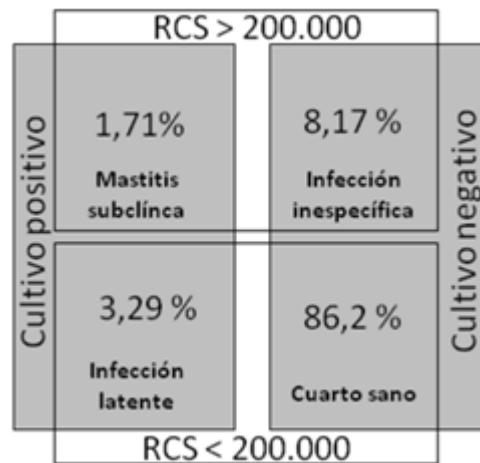


Figura 3.2.1. Resumen del análisis microbiológico y de RCS de los cuartos que no presentaron signos evidentes de infección.

Para eliminar el sesgo producido por la presencia de infecciones persistentes se analizó la proporción de cada uno de los tres tipos de infección en casos nuevos hallándose un 9 / de infecciones nuevas de las cuales 30 / (2,7 / del total) correspondía a infecciones latentes, el 62 / (5,58 / del total) infecciones inespecíficas y el 8 / (0,72 / del total) a mastitis subclínica.

Posteriormente, se analizó la asociación entre el periodo de lactancia y la frecuencia de infecciones intramamarias. En la figura 3.2.2 A. se observa que el número relativo de infecciones nuevas es mayor en los primeros días de lactancia. La asociación entre el número de infecciones nuevas y el periodo de lactancia resultó significativa en un test de χ^2 ($p < 0,01$).

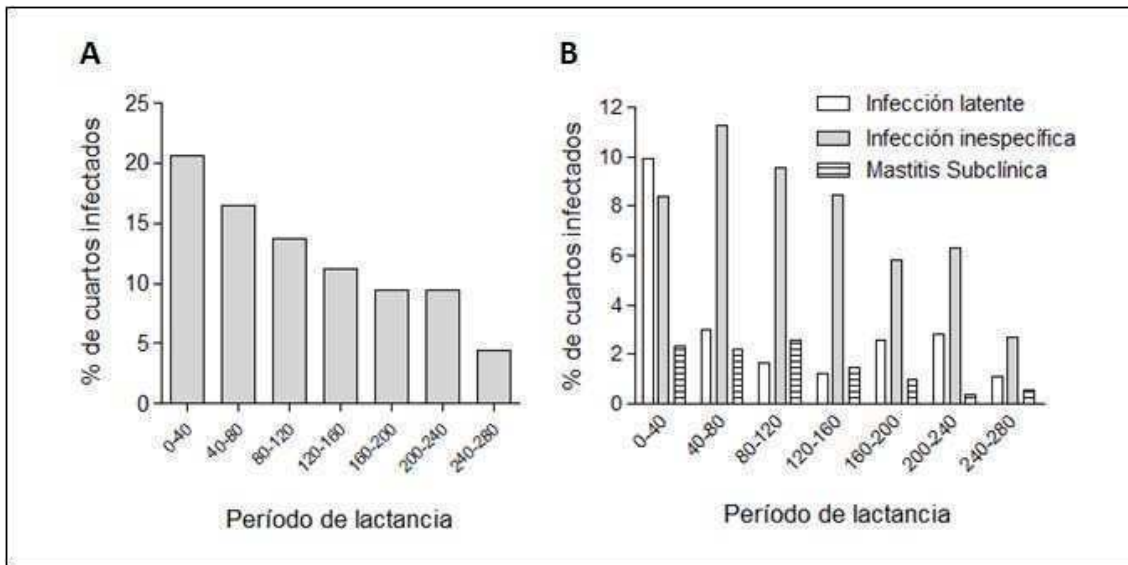


Figura 3.2.2. Asociación entre el periodo de lactancia y la frecuencia de infecciones intramamarias. **A:** porcentaje de cuartos mamarios infectados en función de los días en lactancia. **B:** Porcentaje de cuartos mamarios con infecciones latentes, infecciones inespecíficas y mastitis subclínicas en función de los días en lactancia.

El análisis de las tres formas de infección en función de los días en lactancia (figura 3.2.2 B) muestra que las infecciones latentes son más frecuentes durante los

primeros 40 días de lactancia. Las infecciones inespecíficas, en cambio, son mucho más constantes a lo largo del tiempo. A partir del día 40 post parto constituyen el principal tipo de infección.

La mastitis bovina ha sido definida como una enfermedad multietiológica ya que numerosas especies de agentes patógenos han demostrado ser capaces de producir infecciones intramamarias. En la figura 3.2.3 A se muestra el porcentaje relativo de cuartos positivos para cada patógeno aislado en este estudio. El patógeno más frecuentemente aislado fue el grupo ECN. Esta frecuencia superior puede deberse a un mayor número de infecciones o a la persistencia de la infecciones por ECN a lo largo de distintos muestreos. Para discernir entre estas posibilidades se graficó el porcentaje de infecciones nuevas causadas por cada patógeno (figura 3.2.3 B). Se observa que el porcentaje de infecciones nuevas causadas por ECN es superior al de los otros patógenos indicando que este patógeno es el que causa mayor número de eventos de infección.

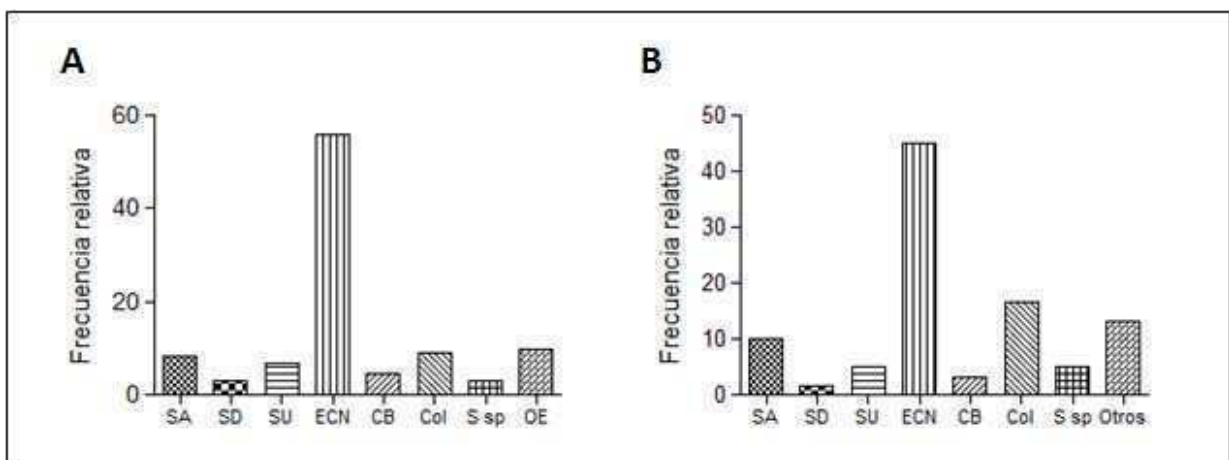


Figura 3.2.3. Microorganismos causantes de mastitis. Porcentaje de cuartos positivos para los distintos microorganismos aislados en este estudio. SA (*Staphylococcus aureus*), SD (*Streptococcus dysgalactiae*), SU (*Streptococcus uberis*), ECN (Estafilococos coagulasa negativos), CB (*Corinebacterium bovis*), Col (Coliformes), S sp (*Streptococcus sp.*), Otros (otros microorganismos). **A:** frecuencia relativa total de cada patógeno. **B:** frecuencia relativa de cada patógeno aislado en infecciones nuevas.

El análisis de asociación entre los distintos agentes causantes de mastitis y el periodo de lactancia mostró que la importancia relativa de cada uno no cambia con los días en lactancia $\text{Chi}^2 > 0,05$. Este resultado, en conjunto con los mostrados en la figura 3.2.2 demuestra que la susceptibilidad a infecciones de la glándula mamaria es mayor en los primeros días de lactancia independientemente del patógeno involucrado.

Al ser invadida por microorganismos patógenos, la glándula mamaria puede o no incrementar los niveles de RCS para dar una mastitis subclínica o una infección latente. En consecuencia, resultaba interesante analizar si existía alguna asociación entre los diferentes patógenos aislados y el tipo de infección detectado. Mientras que *Strep. uberis* y las coliformes se aislaron principalmente en infecciones latentes (con $\text{RCS} < 200.000$). Los estreptococos distintos de *Strep. uberis* se vieron fuertemente asociados a mastitis subclínica ($\text{RCS} > 200.000$). Por otro lado *Staph. aureus* y los ECN se encontraron homogéneamente distribuidos entre estas categorías (tabla 3.2.1). Interesantemente *Strep. uberis* fue hallado principalmente en infecciones persistentes. Estas dos características, la aparente cronicidad y la falta de reacción inflamatoria son más típicas de patógenos contagiosos. En términos generales, es interesante el hecho de que de los cuartos positivos para aislamiento microbiológico hallados en este estudio sólo un 32 / presentaba células somáticas por encima de 200.000. Es decir la mayoría de las infecciones con patógeno identificado no producen una reacción inflamatoria importante.

Patógeno	Infección latente (RCS < 200.000)	Mastitis subclínica (RCS > 200.000)
<i>Staph. aureus</i>	6	5
<i>Strep. uberis</i>	9	0
ECN	47	28
<i>C. bovis</i>	3	3
Coliformes	11	1
<i>Strep. spp.</i> (no <i>uberis</i>)	1	6

Tabla 3.2.1. Patógenos aislados en función del tipo de infección.

Con respecto a los casos de mastitis clínica, se observó una frecuencia de cuartos infectados de 1,5 / . En la figura 3.2.4 se observa que una prevalencia mayor en los primeros 120 días de lactancia que luego se reduce hasta hacerse cero hacia el final de la misma. De los 42 cuartos que presentaron signos clínicos de infección sólo 6 (14 /) resultaron positivos para aislamiento microbiano. En dos de estos cuartos se aisló *Staph. aureus* mientras que los otros 4 cuartos fueron respectivamente positivos para *Strep. dysgalactiae*, *Strep. spp.*, Coliformes y “Otros microorganismos”.

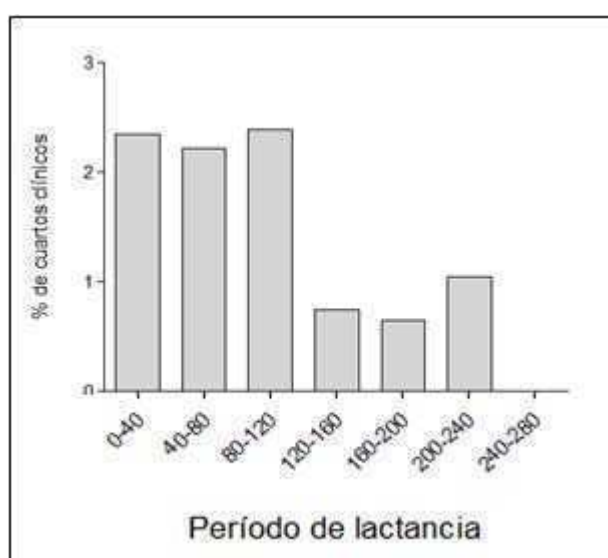


Figura 3.2.4. Frecuencia de eventos de mastitis clínica en cuartos individuales en función del tiempo de lactancia.

En la sección 3.1 de este trabajo de tesis se demostró que las infecciones intramamarias producen un incremento de los niveles de LF estén o no asociadas a signos clínicos. Dado que las vacas de primera lactancia poseen características particulares en cuanto a su sistema inmune, resultaba interesante analizar el efecto de la infección subclínica sobre los niveles de LF en estos animales. Además, las características del muestreo realizado para el presente apartado de esta tesis permitieron analizar la concentración de LF en los distintos tipos de infección intramamaria no clínica.

En primer lugar se compararon los niveles de LF, en cuartos sanos e infectados, observándose un incremento significativo de la concentración de LF en cuartos infectados (figura 3.2.5 A). El análisis de cada tipo de infección por separado (figura

3.2.5 B) mostró que no existen diferencias significativas en la concentración de LF entre estos subtipos de infección intramamaria no clínica.

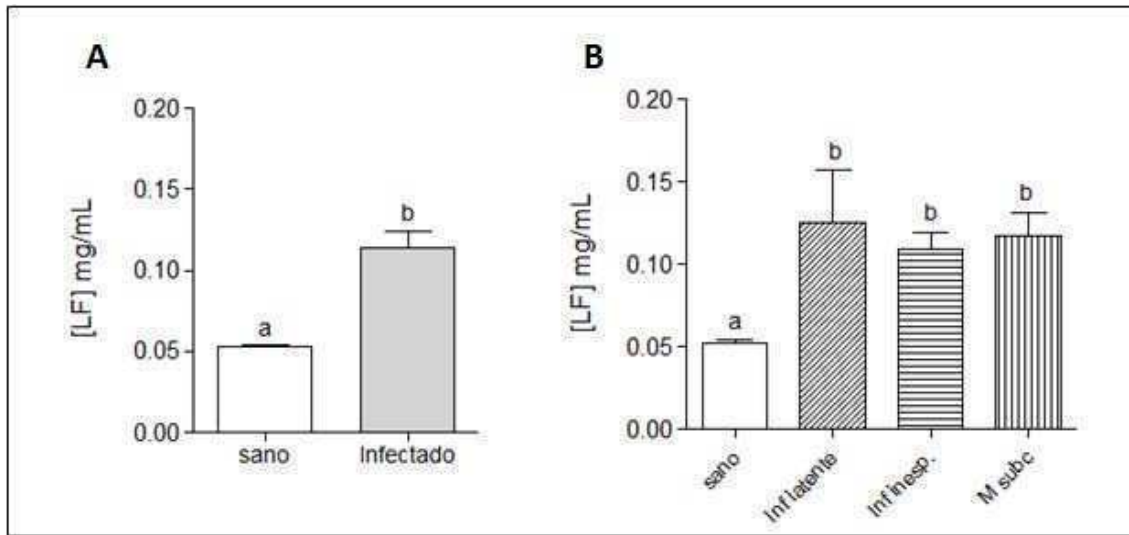


Figura 3.2.5. LF y estatus sanitario en vacas primíparas. A: concentración de LF (mg/mL) (media \pm EEM) en cuartos sanos e infectados sin signos clínicos. **B:** concentración de LF en cuartos sanos y positivos para infección latente, infección inespecífica o mastitis subclínica. Letras diferentes representan $p < 0,001$.

En este trabajo se ha demostrado que existen diferencias en la prevalencia de la infección intramamaria en función de los días en lactancia (figura 3.2.3). Además, numerosos reportes indican que existen diferencias en los valores de ciertos parámetros de la inmunidad innata a lo largo del tiempo (Piccinini *et al.* 2007). Sin embargo, hasta la fecha no hay trabajos que describan los cambios en los niveles de LF asociados a infecciones intramamarias en distintos momentos de la lactancia.

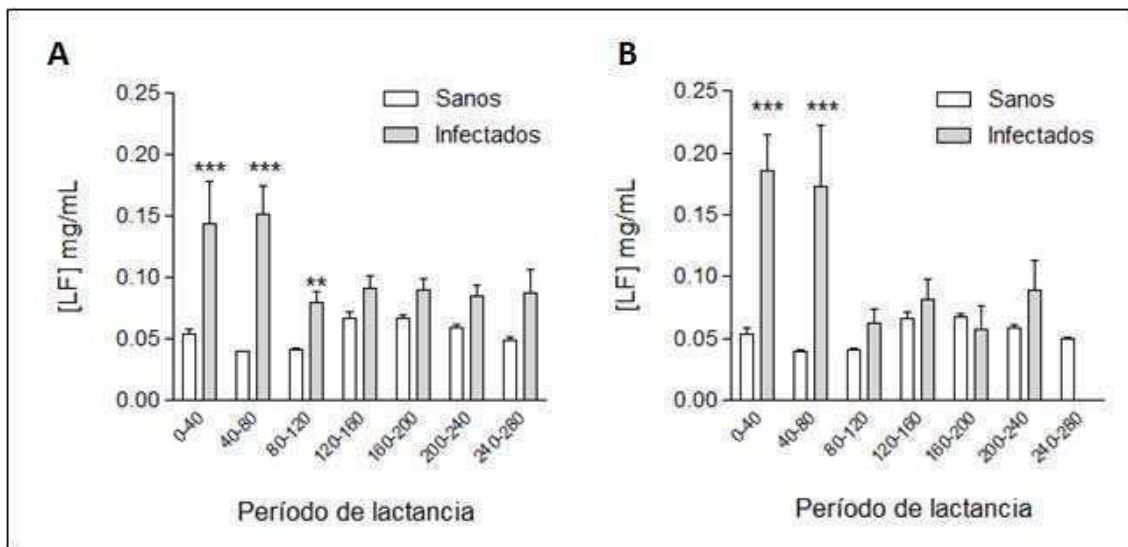


Figura 3.2.6. LF en cuartos sanos e infectados en distintos momentos de lactancia. Concentración de LF (mg/mL) (media \pm EEM) en cuartos sanos e infectados en función del periodo de lactancia. **A:** análisis de cuartos totales. **B:** análisis de primeras infecciones. *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ entre cuartos sanos e infectados del mismo periodo de lactancia.

En la figura 3.2.6 A se muestra la concentración de LF en cuartos infectados y sanos para los diferentes días en lactancia. De esta manera se pretendía analizar el efecto del tiempo de lactancia sobre la respuesta de LF a la infección. Como puede observarse la variación en los niveles de LF asociada a la infección no es constante a lo largo del tiempo de lactancia. El impacto que tiene la infección sobre los niveles de LF es mayor en los primeros días de lactancia. Sin embargo cabe la posibilidad de que las diferencias observadas se deban a que los cuartos infectados en momentos más avanzados de la lactancia sean cuartos infectados más de una vez y que esta infección repetitiva sea la que produzca menores incrementos de LF. Esta posibilidad fue evaluada mediante la comparación de cuartos infectados por primera vez en distinto periodo de la lactancia. En la figura 3.2.6 B se observa que cuartos infectados por primera vez en los primeros días de lactancia presentan un mayor incremento en los niveles de LF que aquellos infectados por primera vez en la mitad de este periodo.

Con respecto a la concentración de LF en cuartos clínicamente infectados, se observó un incremento con respecto a los cuartos infectados no clínicos y los cuartos sanos (figura 3.2.7).

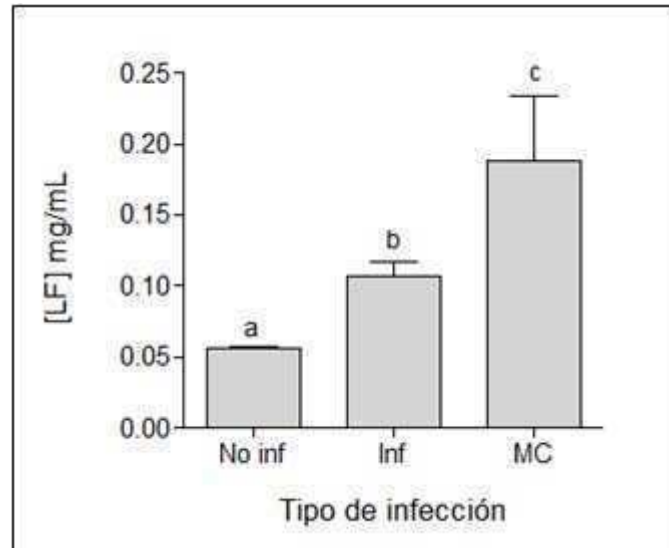


Figura 3.2.7. LF y mastitis clínica en vacas primíparas. Concentración de LF (mg/mL) (media \pm EEM) en cuartos no infectados (No inf), positivos para infección intramamaria (Inf) o clínicamente infectados (MC). Letras distintas representan $p < 0,001$.

Posteriormente se decidió evaluar el impacto de cada agente patógeno identificado en este estudio en los niveles de LF en leche (figura 3.2.8). Este análisis mostró una mayor concentración de LF en los cuartos infectados con estreptococos distintos de *Strep. uberis* (este grupo corresponde a la suma de *Strep. dysgalactiae* y *Streptococcus* spp, ver también figura 3.2.3) y bacterias coliformes.

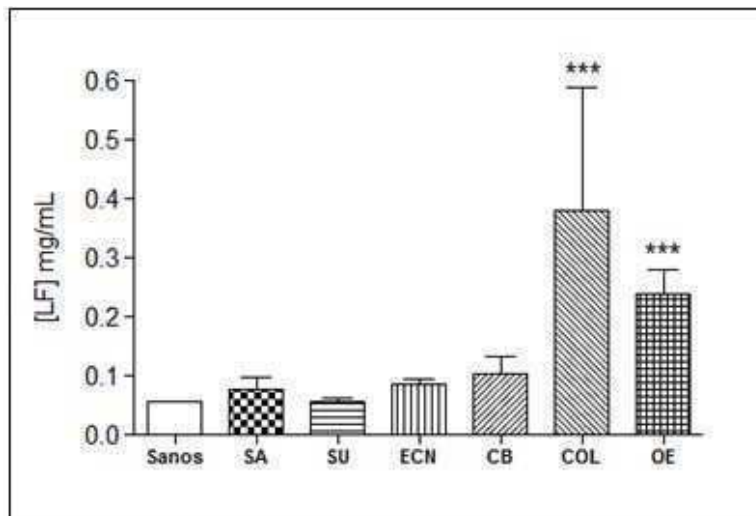


Figura 3.2.8. Lactoferrina y distintos patógenos. Concentración de LF (media \pm EEM) en leche de cuartos sanos o cuartos positivos para *Staphylococcus aureus* (SA), *Streptococcus uberis* (SU) Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN), *Corynebacterium bovis* (CB), bacterias coliformes (COL) y otros estreptococos (OE) (que incluyen aislamientos de *Streptococcus dysgalactiae* y aislamientos de *Streptococcus* spp). *** indica $p < 0,001$ comparado con los cuartos sanos.

En el presente apartado y en la apartado 3.1 de esta tesis se demostró que LF aumenta con la infección. Por lo tanto esta proteína podría ser considerada como un potencial elemento diagnóstico de mastitis. Para evaluar esta posibilidad se realizó una curva de ROC (Receiver Operating Characteristic) que permite analizar la especificidad y la sensibilidad de diferentes concentraciones de LF como punto de corte para determinar si un cuarto está sano o enfermo. Como punto de corte estándar se utilizó el criterio de infección propuesto por IDF ya utilizado previamente en este trabajo. El análisis mostró una curva de ROC leve pero significativa (área bajo la curva=0,60; $p < 0,001$), lo que indica que la concentración de LF es capaz de predecir mejor que el azar la chance de que un cuarto mamario esté infectado (figura 3.2.9. A). El punto de corte óptimo para especificidad y sensibilidad fue de 0,56 mg/mL de LF en leche dando una sensibilidad del 61% y una especificidad del 67%. Los valores predictivos positivos y negativos para este punto de corte fueron 22 y 91% respectivamente. Dado que,

como se ha demostrado en este trabajo, el incremento de LF asociado a la infección es mayor en los primeros días de lactancia que en días posteriores; se realizó un análisis similar tomando solamente cuartos en los primeros 80 días post parto. En este caso, el análisis mostró una curva significativa (área bajo la curva=0,72; $p<0,001$) indicando nuevamente que la concentración de LF puede predecir mejor que el azar la chance de que un cuarto esté sano o infectado (figura 3.2.9. B). El punto de corte óptimo para especificidad y sensibilidad fue de 0,55 mg/mL de LF en leche dando 58 / de sensibilidad, 76 / de especificidad y valores predictivos positivos y negativos de 35 y 89 / respectivamente.

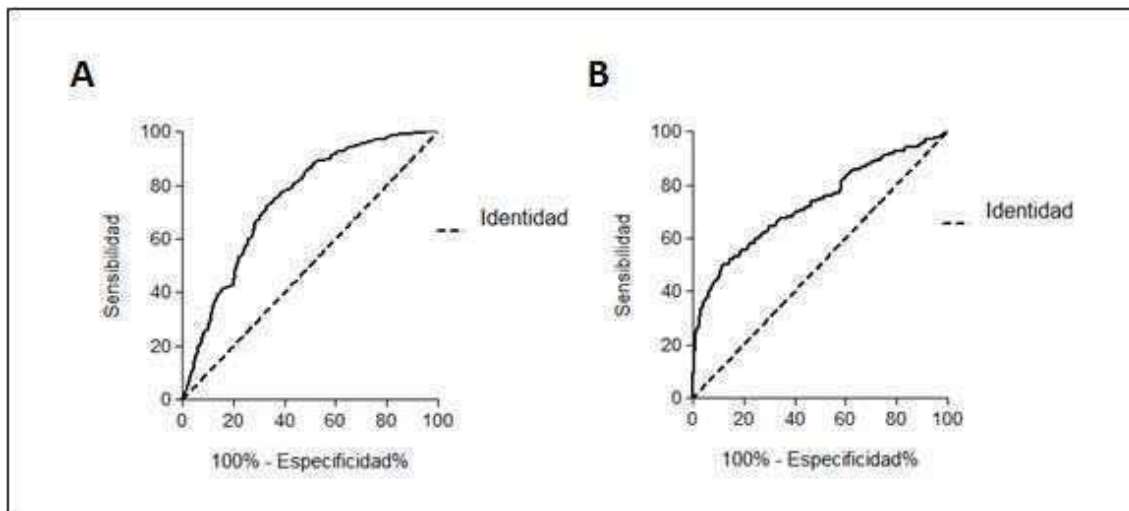


Figura 3.2.9. LF en el diagnóstico de infecciones. Curvas de ROC de sensibilidad vs. 100/ -especificidad para distintas concentraciones de LF como punto de corte para determinar el estatus sanitario de un cuarto mamario. Se tomó el criterio de la IDF como estándar dorado (ver cuadro 1.1 en introducción). La línea punteada indica un valor predictivo igual a 0. **A:** análisis del total de los cuartos del estudio **B:** análisis de los primeros 80 días de lactancia.

Hasta ahora se ha discutido el potencial diagnóstico de LF para distinguir un cuarto sano de uno infectado. Por otro lado sería también interesante establecer si LF es un indicador de susceptibilidad para la infección. Es decir; ¿Presentan los cuartos mamarios que van a infectarse niveles alterados de LF? Para contestar esta pregunta se tomaron dos aproximaciones alternativas. En primer lugar se analizó la

concentración de LF en cuartos sanos de vacas que presentan por lo menos un cuarto infectado. Con esto se buscó evaluar la hipótesis de que vacas que naturalmente tienen menor concentración de LF son más susceptibles a la infección que vacas con mayores concentraciones basales de LF. Esta hipótesis predice que los cuartos sanos que son vecinos a cuartos infectados tendrían menores niveles de LF que cuartos sanos de vacas sanas. En la figura 3.2.10 se observa que este no es el caso ya que ambos grupos presentan concentraciones similares de LF.

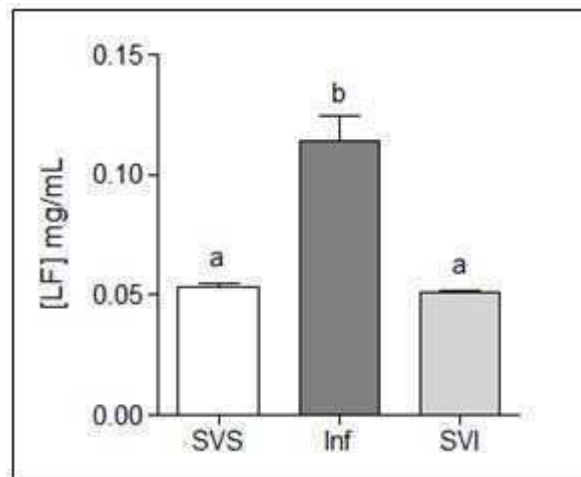


Figura 3.2.10. LF en cuartos vecinos. Concentración de LF en cuartos sanos de vacas sanas (sin ningún cuarto infectado) (SVS), cuartos infectados (Inf), o cuartos sanos de vacas infectadas (SVI) (con al menos un cuarto infectado). Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0,001$.

Posteriormente se decidió evaluar si existía una susceptibilidad a nivel de cuarto por bajos niveles de LF. Es decir, si los cuartos con bajos niveles de LF son más propensos a las infecciones que los cuartos con altos niveles de LF. Si esto fuese así los cuartos infectados deberían presentar bajos niveles de LF en los días previos al evento de infección. En consecuencia, se comparó la concentración de LF de cuartos mamarios previo a la infección con la de cuartos que no presentaron infecciones durante todo el muestreo. En la figura 3.2.11 A se grafica la concentración de LF de los cuartos mamarios que van a infectarse, de cuartos que están infectados y de cuartos que ya se han infectado. Se puede observar que los cuartos que van a infectarse no presentaron

niveles reducidos de LF comparado con los cuartos que nunca se infectaron. Este resultado sugiere que las bajas concentraciones de LF no son un prerrequisito para que ocurra la infección, de hecho los cuartos mamarios destinados a infectarse presentan niveles levemente aumentados de LF comparado con los controles. Al desagregar el intervalo pre y post infección de la figura 3.2.11 A en intervalos más pequeños (figura 3.2.11 B) se puede observar que la concentración de LF es levemente mayor en tiempos extensos antes de la infección para disminuir al aproximarse la misma.

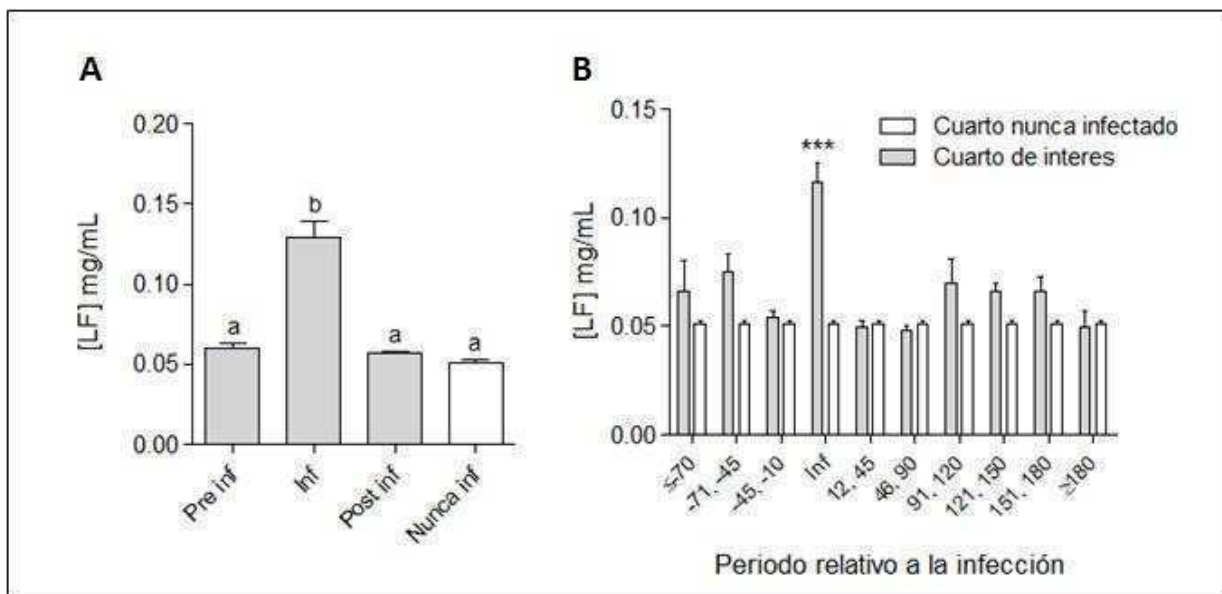


Figura 3.2.11. LF en los días previos y posteriores a la infección. Concentración de LF en cuartos individuales en los días previos o posteriores a la infección, comparado con los cuartos que no presentaron eventos de infección a lo largo de todo el muestreo. **A:** análisis global de la concentración de LF en los días previos y posteriores a la infección. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0,001$. **B:** análisis por intervalos desagregados de los días previos y posteriores a la infección. *** indica $p < 0,001$ comparado con cuartos nunca infectados.

De los resultados anteriores se desprende que los cuartos que se van a infectar parecen presentar mayores niveles de LF que los que van a permanecer sanos. Llevando este razonamiento algo más lejos se podría pensar que los niveles de LF durante los primeros días de lactancia podrían ser predictivos de futuros eventos de

infección. Para explorar esta posibilidad se realizó un estudio de tiempo libre de enfermedad mediante un diagrama de Kaplan-Meier. Los cuartos mamarios fueron divididos en aquellos que presentaban, durante los primeros días de lactancia, una concentración de LF superior a 0,1 mg/mL; de entre 0,1 y 0,05 mg/mL; o menor a 0,05 mg/mL. En la figura 3.2.12 A se observa que el tiempo libre de enfermedad es menor en aquellos cuartos con altos niveles de LF en el periparto ($p < 0,05$). Es decir, la concentración de LF parece estar positivamente relacionada con la probabilidad de infección en días subsiguientes. Este resultado es consistente con aquellos mostrados en la figura 3.2.11. La figura 3.2.12 B muestra que los cuartos infectados en el periparto tienen mayor probabilidad de infectarse en periodos posteriores que aquellos que no lo están. Sin embargo, la capacidad predictiva de LF sobre futuras infecciones también se verificó en cuartos sanos (figura 3.2.12 C). Tomados en conjunto, estos resultados estarían indicando que LF es, además de una herramienta diagnóstica, un posible indicador de riesgo de futuras infecciones intramamarias.

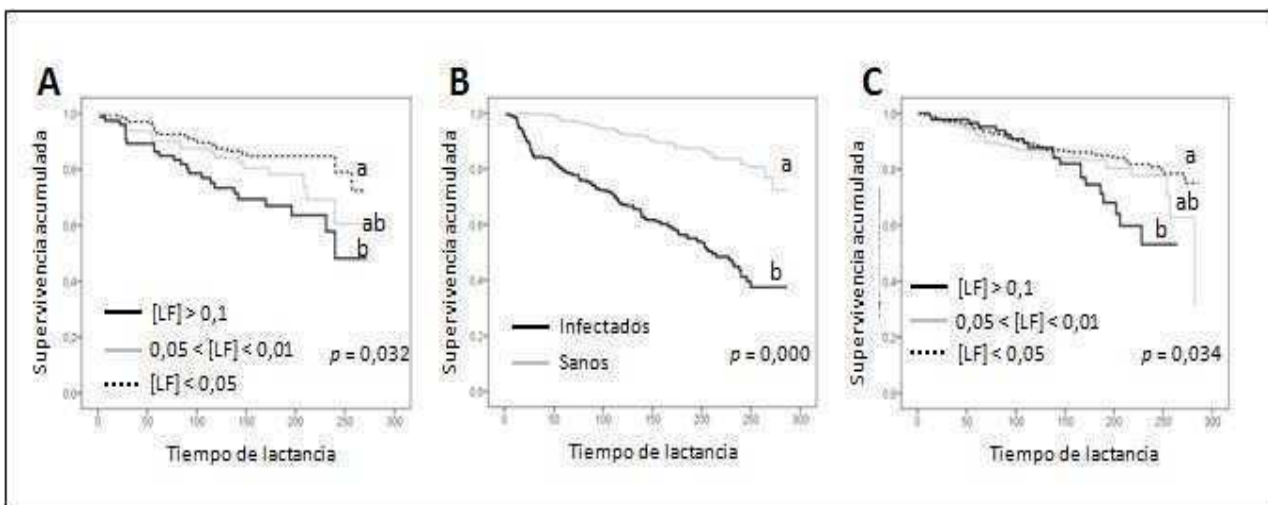


Figura 3.2.12. Relación entre los niveles de LF en los primeros días post parto y el riesgo de infección. A: análisis de Kaplan-Meier de tiempo libre de enfermedad en cuartos que presentaron una concentración de LF en los primeros 15 días de lactancia menor a 0,05 mg/mL (línea punteada) de entre 0,05 y 0,1 mg/mL (línea gris) y mayor a 0,1 mg/mL (línea negra). **B:** análisis de Kaplan-Meier de tiempo libre de enfermedad en cuartos que presentaron infección (línea negra) o permanecieron sanos en los primeros 15 días de lactancia (línea gris). **C:** Análisis de Kaplan-Meier idéntico al presentado en A pero tomado solamente cuartos que no

presentaron infección en los primeros días de lactancia. En los tres gráficos, diferentes letras indican curvas significativamente diferentes.

Los resultados presentados hasta el momento, concernientes a los niveles de LF en vacas de primera lactancia, sugieren que LF tiene un potencial valor diagnóstico sobre las infecciones intramamarias a nivel de cuarto. Sin embargo la recolección y análisis de muestras individuales de cuarto de todo un rodeo es un proceso complejo, costoso y difícilmente practicable. En consecuencia, se decidió analizar la relación entre los niveles de LF y parámetros de sanidad a nivel de tanque. Para esto se realizó un análisis de regresión múltiple utilizando *concentración de LF (mg/mL)* como variable independiente y como variables explicativas: *recuento de células somáticas*, *recuento de bacterias totales en placa*, *recuento de termofílicas*, *recuento de coliformes totales*, *recuento de Streptococcus agalactiae*, *recuento de Staphylococcus aureus*, *recuento de Streptococcus spp.*, *recuento de Staphylococcus spp.* Este análisis (tabla 3.2.1) mostró que las variables *recuento de células somáticas*, *recuento de bacterias totales* y *recuento de Streptococcus agalactiae* explican significativamente la concentración de LF, $p < 0,001$, $R^2_{\text{corregido}} = 0,705$. El recuento de bacterias totales y el RCS predijeron un aumento en la concentración de LF. Curiosamente el recuento de *Streptococcus agalactiae* predice negativamente la concentración de LF lo cual significa que a mayores concentraciones de esta bacteria se espera una menor concentración de LF. Esto podría explicarse por una posible función protectora de LF en la glándula mamaria bovina.

Variables incluidas	Beta Estandarizado	<i>t</i>	Significancia
RCS	1,069	5,435	0,000
Recuento de <i>Strep. agalactiae</i>	-0,968	-4,185	0,001
Recuento de bacterias totales	0,481	2,321	0,036

Tabla 3.2.1. Relación entre la concentración de LF y variables de sanidad del tambo. Resumen del análisis de regresión múltiple de concentración de LF en función de variables asociadas al estatus sanitario del tambo. Sólo se incluyen las variables que explican significativamente la concentración de LF.

3.3. Actividad antimicrobiana de β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina (β -LG) es una proteína presente en la leche de los rumiantes y muchos otros mamíferos aunque ausente en humanos y lagomorfos. A pesar del enorme cuerpo de conocimiento existente en cuanto a su estructura terciaria y cuaternaria y sus propiedades de binding (Kontopidis *et al.* 2004), no existe acuerdo absoluto con respecto a la función biológica de β -LG. Dado que es una proteína muy abundante en la leche bovina y que sus concentraciones son altas en los primeros momentos de la lactancia (Perez *et al.* 1990), se tomó como siguiente objetivo de esta tesis estudiar la posible acción antimicrobiana de β -LG contra bacterias causantes de mastitis.

Algunos autores han reportado actividades biológicas espurias y alteraciones en la estructura terciaria en preparaciones comercial de β -LG (de Jongh *et al.* 2001). En vista de estos problemas y al igual que para los ensayos de LF ya descriptos en este tesis, se decidió realizar una purificación de β -LG en nuestro laboratorio que garantice la integridad estructural de la proteína. Para esto se utilizó un protocolo de purificación “suave” de acuerdo a lo reportado por Jongh *et al.* (2001). En base a resultados previos, el genotipo de β -LG más frecuente en Argentina es el homocigota para el alelo B (β -LG BB) (Gigli *et al.* 2004). En consecuencia, se dio comienzo a los estudios de actividad antimicrobiana con β -LG purificada de leche de animales β -LG BB. La identificación genotípica fue realizada en base a la movilidad diferencial de las distintas variantes alélicas de β -LG al ser resueltas en un gel nativo de poliacrilamida 15 / (figura 3.3.1.A) tal como fue descripto por Ye *et al.* (2000). La β -LG purificada fue analizada por SDS-PAGE teñido con plata y por Western blot con anticuerpos comerciales anti β -LG para verificar su pureza e identidad respectivamente (figura 3.3.1. B). Además, la proteína obtenida fue enviada al LANAIS-Pro donde fue analizada por cromatografía de fase reversa acoplada a espectrometría de masa (RP-HPLC-MS por sus siglas en inglés) y por huella dactilar de péptidos mediante MALDI-TOF-TOF. El peso molecular determinado por esta técnica fue consistente con el esperado para β -LG y los péptidos observados en el MALDI-TOF-TOF coincidieron con los esperados de la digestión trípica de β -LG. No se observó la presencia de péptidos contaminantes.

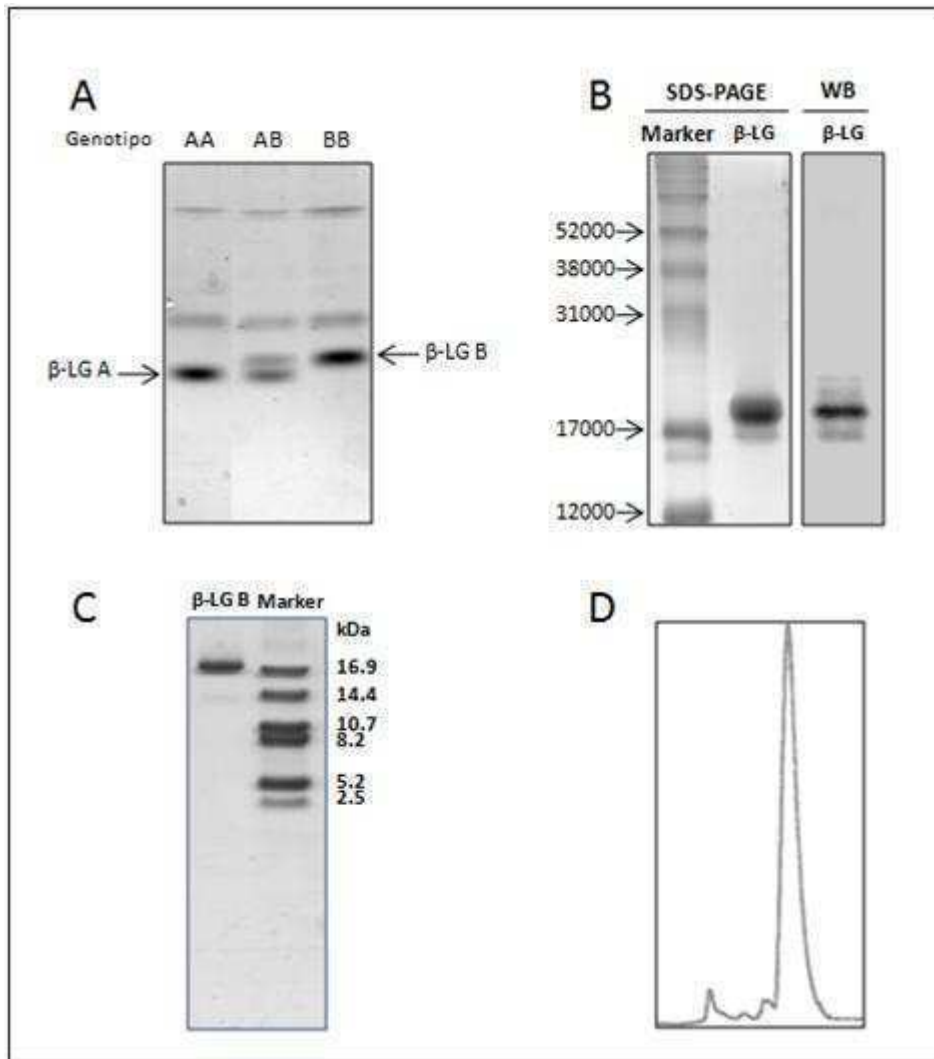


Figura 3.3.1. Purificación y análisis de β -LG. **A:** Sueros de leche de vacas de tres genotipos diferentes (homocigota para el alelo A, heterocigota u homocigota para el alelo B) fueron resueltos en PAGE no desnaturizante. Se pueden observar las diferencias en la movilidad electroforética de las dos variantes de β -LG. **B:** β -LG purificada fue resuelta en SDS-PAGE 15 / y teñida con plata o transferida y sometido a western blot para analizar pureza e identidad respectivamente. **C y D:** β -LG purificada fue corrida en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5 / o en cromatografía analítica de tamiz molecular para verificar la ausencia de péptidos contaminantes.

Una vez asegurada la identidad y pureza de β -LG se procedió a evaluar su posible actividad antimicrobiana. Para esto se utilizaron 4 aislamientos de *Staph. aureus*, *E. coli* y *Strep. uberis* aislados de cuartos mamario subclínicamente infectados. Dado que la actividad antimicrobiana de LF sobre algunos de estos microorganismos ya había sido probada en el apartado 3.1 de esta tesis, esta proteína fue incluida como control positivo de inhibición del crecimiento. En la figura 3.3.2 pueden observarse los resultados de estos ensayos. La β -LG inhibió el crecimiento de *Staph. aureus* a niveles comparables con LF. Con respecto a las otras dos especies evaluadas, β -LG y LF parecen tener actividades complementarias. *Strep. uberis* resultó sensible a β -LG pero no a LF mientras que *E. coli* fue resistente a β -LG pero sensible a LF. Se observó cierto grado de variabilidad en la sensibilidad a las proteínas ensayadas entre distintos aislamientos de una misma especie

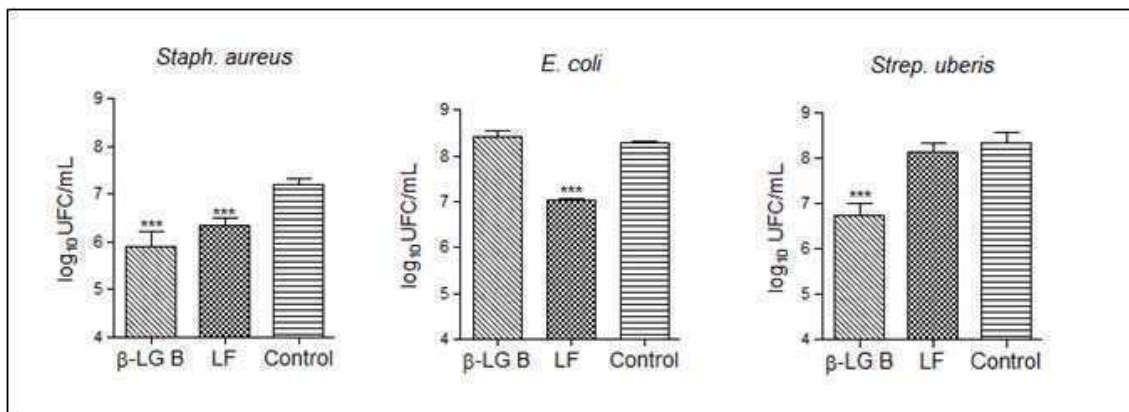


Figura 3.3.2. Actividad de inhibición de crecimiento de β -LG contra bacterias causantes de mastitis. Cuatro aislamientos locales de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis* fueron cultivados en presencia de 2 mg/mL de β -LG, de 2 mg/mL de LF o condiciones control. La cantidad de bacterias viables fue determinada por recuento en placa luego de 6 h de incubación. Las columnas representan la media \pm EEM de los cuatro aislamientos ensayados en triplicado. *** $p < 0,001$.

La actividad inhibitoria de β -LG sobre *Staph. aureus* y *Strep. uberis* mostró un patrón concentración dependiente presentando una pendiente significativamente

distinta de 0 ($p < 0,001$) para la relación log-UFC/mL vs. concentración de β -LG (figura 3.3.3).

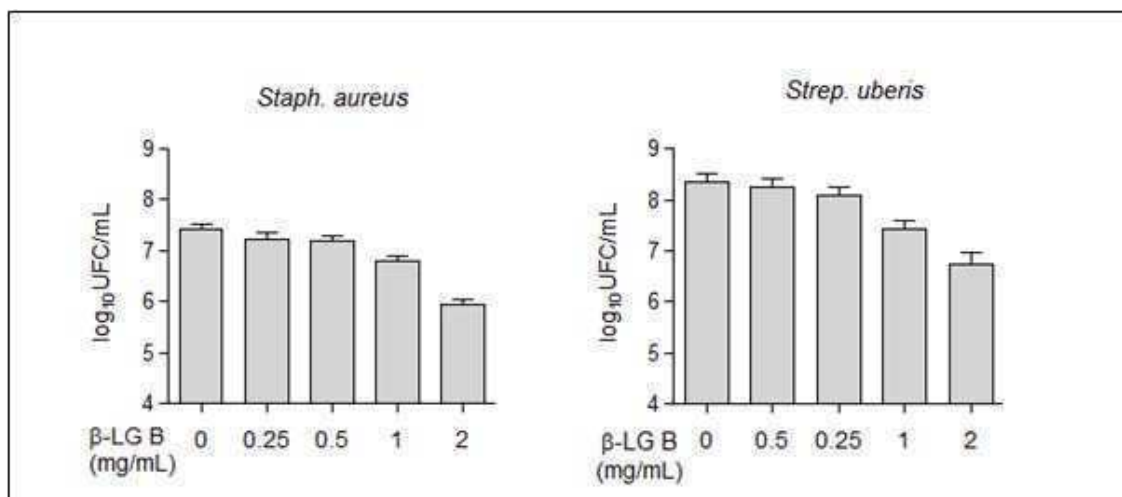


Figura 3.3.3. Actividad concentración dependiente de β -LG. Cuatro aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* fueron cultivados con concentraciones variables de β -LG. La cantidad de bacterias viables fue determinada por recuento en placa luego de 6 h de incubación. Las columnas representan la media \pm EEM de los cuatro aislamientos ensayados en triplicado.

Para descartar la posibilidad de que el efecto antimicrobiano observado se deba en realidad a pequeños péptidos resultantes de la degradación de β -LG, la proteína purificada en este trabajo fue resuelta en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5 / . Se observó una única banda de un peso molecular acorde al esperado y ausencia de bandas de pesos menores. Esta ausencia de péptidos de degradación fue confirmada por cromatografía analítica de tamiz molecular (figura 3.3.1. C y D).

Se ha mencionado que existen numerosas variantes genéticas de β -LG entre las que β -LG B y β -LG A son las más frecuentes (ver apartado 1.11 en introducción). Dado que se había probado que β -LG B presenta actividad antimicrobiana se decidió analizar si β -LG A muestra un comportamiento similar. Para esto se purificó β -LG de leche de vacas cuyo genotipo es β -LG AA mediante un procedimiento idéntico al utilizado

previamente para β -LG B. La actividad antimicrobiana de la proteína obtenida fue comparada con la de β -LG B. En la figura 3.3.4 se muestra que β -LG A también posee actividad antimicrobiana, y que ésta es leve pero significativamente mayor a la de β -LG B.

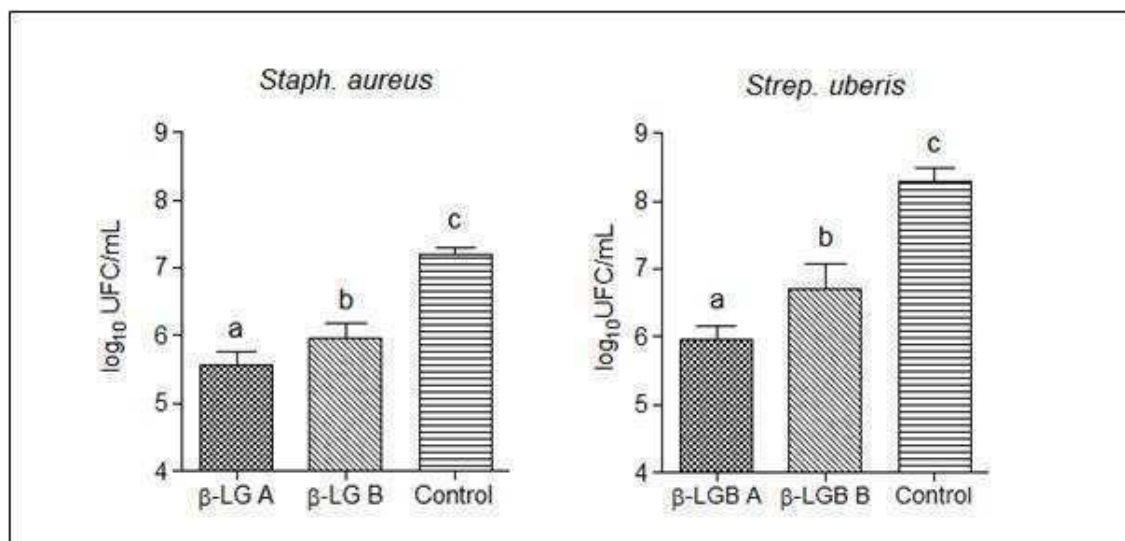


Figura 3.3.4. Actividad antimicrobiana de distintas variantes genéticas de β -LG. Cuatro aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* fueron cultivados en presencia de 2 mg/mL de β -LG aisladas de vacas AA (β -LG A) o vacas BB (β -LG B). El número de bacterias viables fue determinado por recuento en placa luego de 6 h de incubación. Las columnas representan la media \pm EEM de los cuatro aislamientos ensayados en triplicado. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,001$).

En la figura 3.3.2 se demostró que β -LG y LF poseen actividades complementarias contra *Strep. uberis* y *E. coli* y que ambas son capaces de inhibir el crecimiento de *Staph. aureus*. Se decidió entonces analizar la capacidad de β -LG y LF de actuar en conjunto contra *Staph. aureus*. Para esto se co-incubaron ambas proteínas con *Staph. aureus*. Dado que es posible que una acción combinada de β -LG y LF se produzca realmente in vivo, en este ensayo se utilizaron concentraciones fisiológicas de ambas proteínas. En la figura 3.3.5 se observa que el agregado de LF produjo un incremento significativo en la capacidad inhibitoria de β -LG A contra *Staph.*

aureus indicando un efecto aditivo de estas proteínas sobre el crecimiento de esta bacteria.

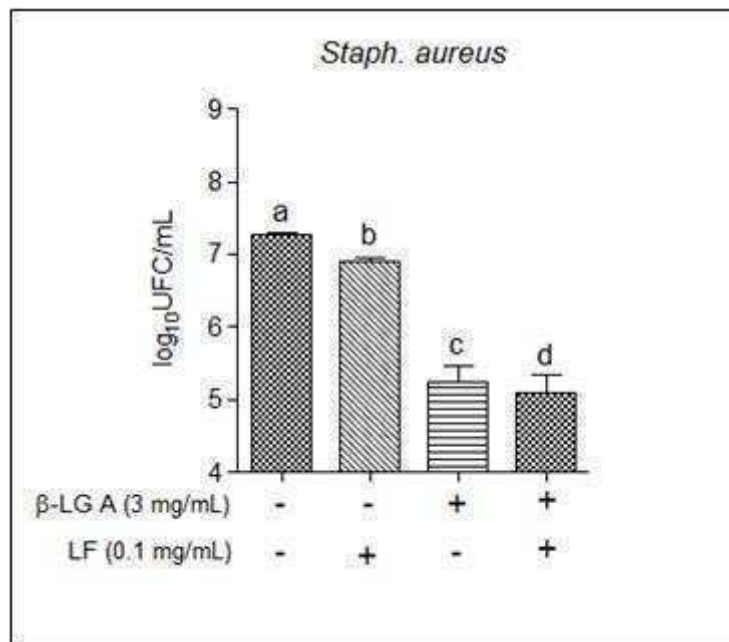


Figura 3.3.5. Actividad de β-LG en conjunto con LF. Cuatro aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron cultivados en presencia de 3 mg/mL de β-LG; 0,1 mg/mL de LF; ambas proteínas en las mencionadas concentraciones; o en condiciones control. El número de bacterias viables fue determinado por recuento en placa luego de 6 h de incubación. Las columnas representan la media ± EEM de los cuatro aislamientos ensayados en triplicado. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,001$).

3.4. Análisis de la potencial aplicación biotecnológica de péptidos derivados de lactoferrina

En los apartados anteriores de los resultados de esta tesis se demostró la importancia de la LF en la inmunidad de la glándula mamaria bovina, tanto en vacas pluríparas como de primera lactancia.

Desde su descubrimiento y aislamiento el número de propiedades descritas para la LF ha venido en constante aumento. Prácticamente desde un principio, cada hallazgo ha sido acompañado de su propia proyección biotecnológica (Tomita *et al.* 2009). Numerosos autores han propuesto el uso de LF como herramienta de prevención y tratamiento de la mastitis bovina (Kutilla *et al.* 2004; Liu *et al.* 2005; Komine *et al.* 2006; Petitclerc *et al.* 2007). Sin embargo existen algunos problemas relacionados con esta aplicación. La actividad biológica específica de la LF sobre algunas bacterias es relativamente baja. En muchos casos, la presencia de Fe^{++} (Nonnecke & Smith 1984) impide por completo esta actividad, limitando su relevancia en algunos fluidos biológicos, sobre todo en aquellos donde existen altas concentraciones de citrato (Bishop *et al.* 1976). Sin embargo, hay más en la LF que la LF misma y, como ya se ha indicado antes, se ha reportado que es posible obtener, por digestión química o enzimática, péptidos derivados de LF con una actividad antimicrobiana incrementada y aparentemente independiente de Fe^{++} (Saito *et al.* 1991; Tomita *et al.* 1991; Tomita *et al.* 2002). Estas dos propiedades convierten a estos péptidos en candidatos con muy buena proyección biotecnológica.

En relación a lo antes mencionado el objetivo del presente apartado de esta tesis es generar péptidos derivados de LF, caracterizar su actividad y analizar su potencial uso tecnológico para incrementar la resistencia del ganado lechero a la mastitis bovina.

3.4.1. Generación y caracterización de péptidos de lactoferrina con actividad antimicrobiana aumentada.

Utilizando la técnica de purificación en batch desarrollada durante este trabajo se aisló LF de muestras de leche bovina. Una vez verificada su pureza por SDS-PAGE, western blot y ensayos enzimáticos (ver materiales y métodos y figura 3.1.1), la preparación de LF fue liofilizada y resuspendida para ser luego digerida con pepsina a pH 3,0 (ver materiales y métodos). La actividad antimicrobiana del digerido obtenido fue evaluada en *Staph. aureus* y *E. coli*. Estos patógenos fueron seleccionados por ser *Staph. aureus* uno de los principales agentes causantes de mastitis en Argentina (Calvinho & Tirante 2005), y otros países en vías de desarrollo y *E. coli* por ser un patógeno emergente de gran importancia en aquellos sistemas de ordeño que han implementado sistemas de control para patógenos contagiosos. Además, de esta forma se contaba con representantes Gram positivos y Gram negativos, contagiosos y ambientales.

La efectividad de la digestión de LF fue evaluada por SDS-PAGE (figura 3.4.1. A). El digerido obtenido mostró una actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *Staph. aureus* superior a la de la proteína intacta (figura 3.4.1 B).

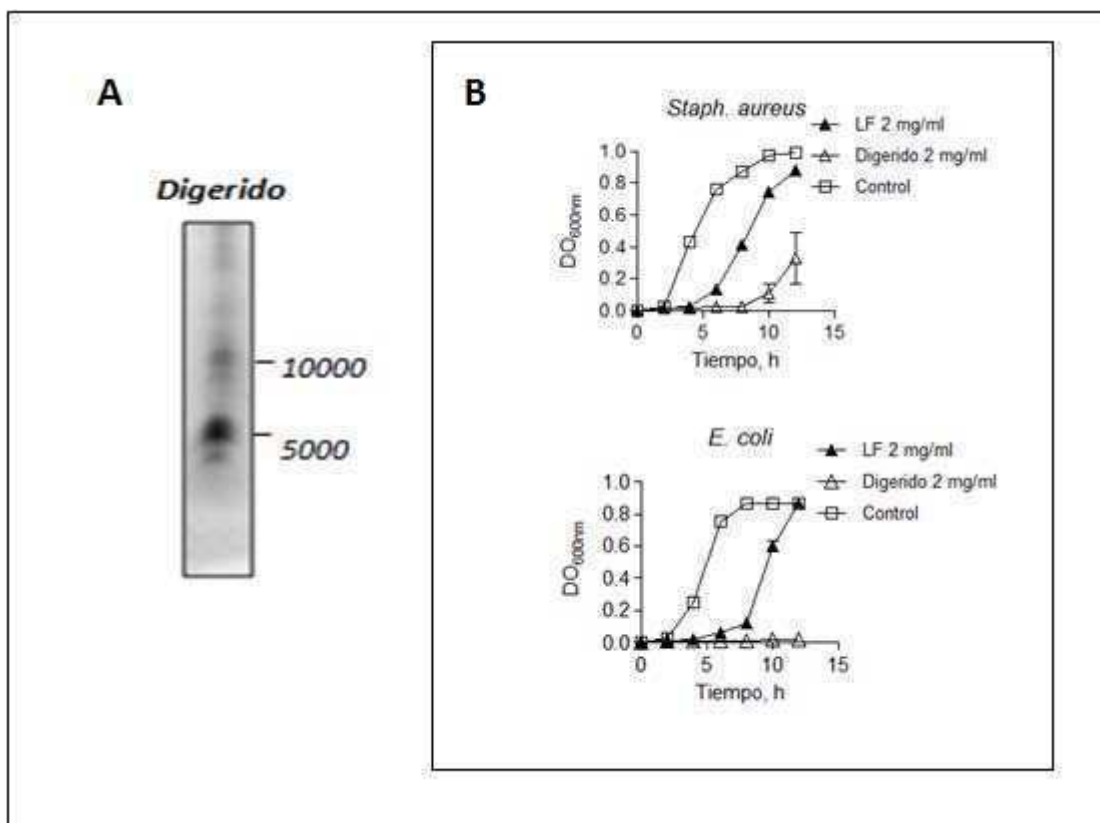


Figura 3.4.1. Actividad antimicrobiana de un digerido de LF con pepsina. A: Lactoferrina obtenida en este estudio fue digerida con pepsina y resuelta en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5 / . **B:** Actividad del digerido o LF intacta contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Con el objetivo de evaluar en mayor detalle la actividad de este digerido, el mismo fue fraccionado por peso molecular. Para esto se utilizó una técnica de diálisis doble (ver detalles en materiales y métodos) que consistió en introducir el digerido completo de LF en una bolsa de diálisis de 12.000 Da de punto de corte y colocar a su vez esta bolsa en el interior de otra bolsa de diálisis con punto de corte de 3.500 Da. Este arreglo de doble membrana fue dializado exhaustivamente contra agua luego de lo cual se recuperaron las fracciones de dentro de la bolsa interior (fracción interior) y de la bolsa exterior (fracción exterior). Se esperaba que la composición de la fracción interior sea similar a la del digerido total con un enriquecimiento en péptidos mayores

a 12.000 Da. Por otra parte, en la fracción exterior se esperaba la presencia de péptidos menores de 12.000 Da. Estas suposiciones fueron confirmadas resolviendo ambas fracciones en Tris-tricina SDS-PAGE (figura 3.4.2 A). Nos preguntamos entonces si era posible mediante esta técnica disecar la actividad de LF contra distintos patógenos. Para esto, se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas. En la figura 3.4.2 B se muestra que la fracción exterior, que está enriquecida en péptidos pequeños, presenta actividad antimicrobiana contra *Staph. aureus* pero no contra *E. coli*. Por otro lado, la fracción interior presenta actividad contra *E. coli* y *Staph. aureus*. Estos resultados sugieren que la función de LF contra distintos patógenos podría estar localizada en distintos dominios de la molécula.

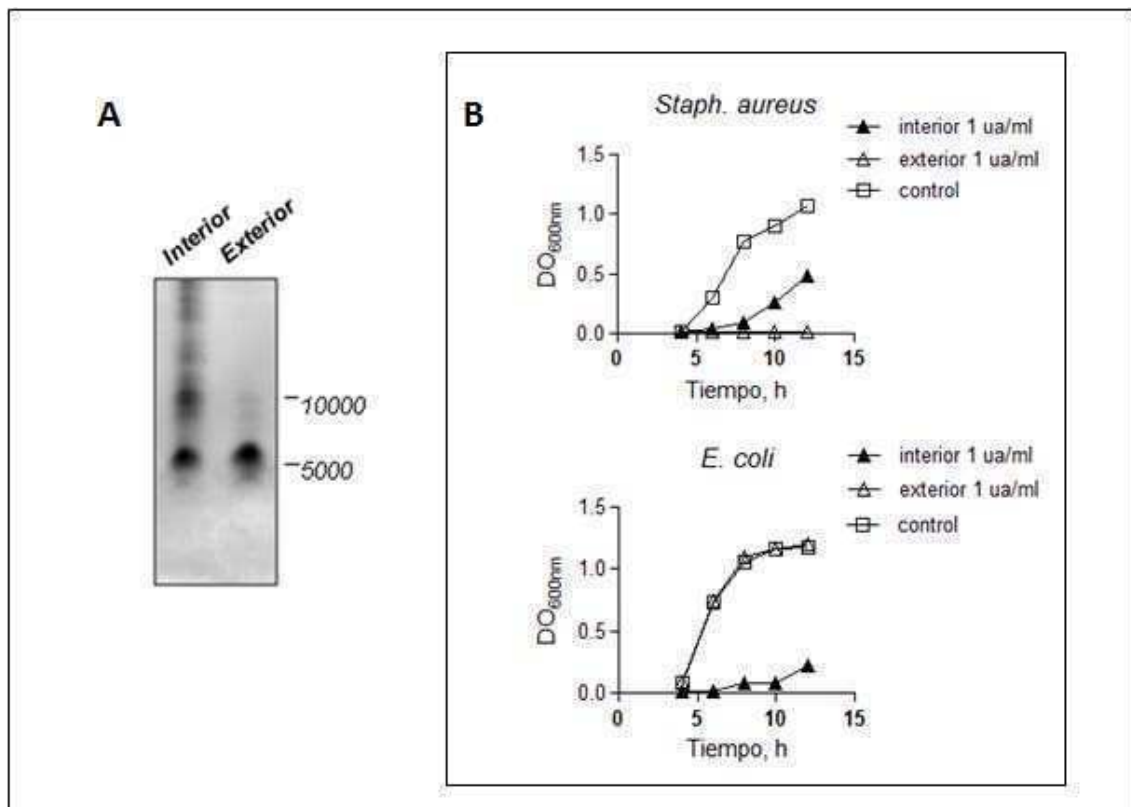


Figura 3.4.2. Actividad de dos fracciones del digerido de LF con pepsina separadas por peso molecular mediante diálisis doble. A: El digerido de LF separado por diálisis doble fue resuelto en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5 / . **B:** Una unidad de absorbancia_{280nm} (ua) de cada fracción fue incubada con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* para evaluar su potencial actividad antimicrobiana.

Con el objetivo de continuar con la caracterización de las fracciones obtenidas por diálisis doble, las mismas fueron sometidas a cromatografía de tamiz molecular y cromatografía de intercambio catiónico (figura 3.4.3). El primer ensayo permitió determinar que la proporción de péptidos catiónicos en la fracción interior era mayor que en la exterior. Por otro, lado la resolución en cromatografía de tamiz molecular mostró que ambas fracciones eran complejas en cuanto a su composición peptídica, lo que volvía virtualmente imposible el aislamiento de los péptidos responsable de las funciones observadas.

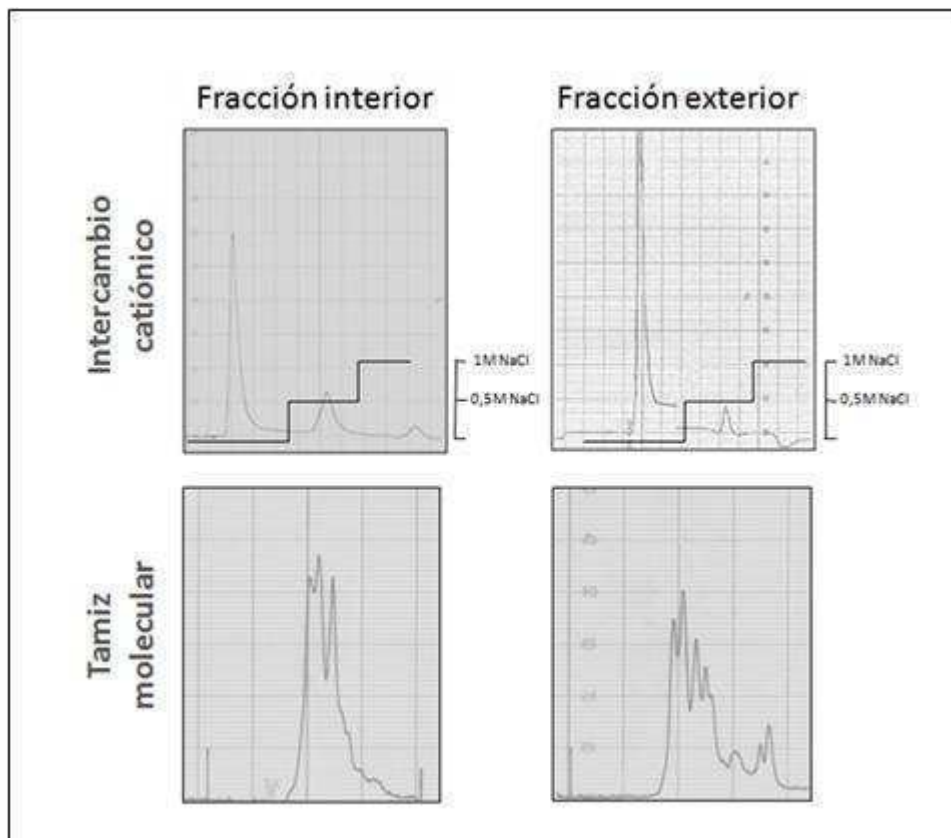


Figura 3.4.3. Caracterización del digerido de lactoferrina. Análisis de la composición de la fracción interior y exterior del digerido de LF mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía analítica de tamiz molecular.

Como una estrategia alternativa y teniendo en cuenta trabajos previos que indican que muchos péptidos antimicrobianos son de naturaleza catiónica (Hancock &

Diamond 2000), se fraccionó el digerido total de pepsina mediante una columna de intercambio catiónico eluida en 3 pasos de fuerza iónica a pH 7,0. De esta manera se esperaba obtener una fracción de péptidos neutros o aniónicos, que no interaccionan con la columna y aparecen en el percolado; péptidos levemente catiónicos a pH 7,0 que eluyen con baja fuerza iónica (0,5 M NaCl) y péptidos altamente catiónicos a pH 7,0 que sólo eluyen al lavar la columna con 1 M NaCl (figura 3.4.4).

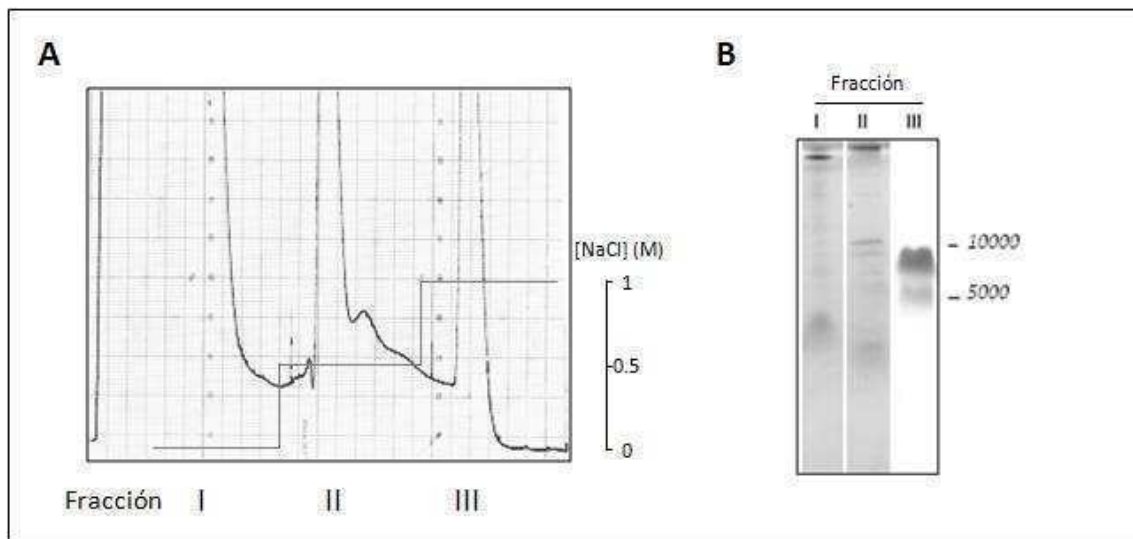


Figura 3.4.4. Fraccionamiento de péptidos por cromatografía de intercambio catiónico. **A:** el digerido de LF fue corrido en una columna preparativa de intercambio catiónico eluido en pasos de 0,5 M y 1 M NaCl. **B:** resolución de las fracciones en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5/ .

Las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio catiónico fueron posteriormente evaluadas en función de su capacidad de inhibir el crecimiento de *Staph. aureus* y *E. coli* de manera similar a lo realizado con las fracciones “interior” y “exterior”. En la figura 3.4.5 se muestra que la fracción III que corresponde a péptidos catiónicos es capaz de inhibir a *Staph. aureus* y a *E. coli* aunque este último microorganismos parece levemente menos sensible.

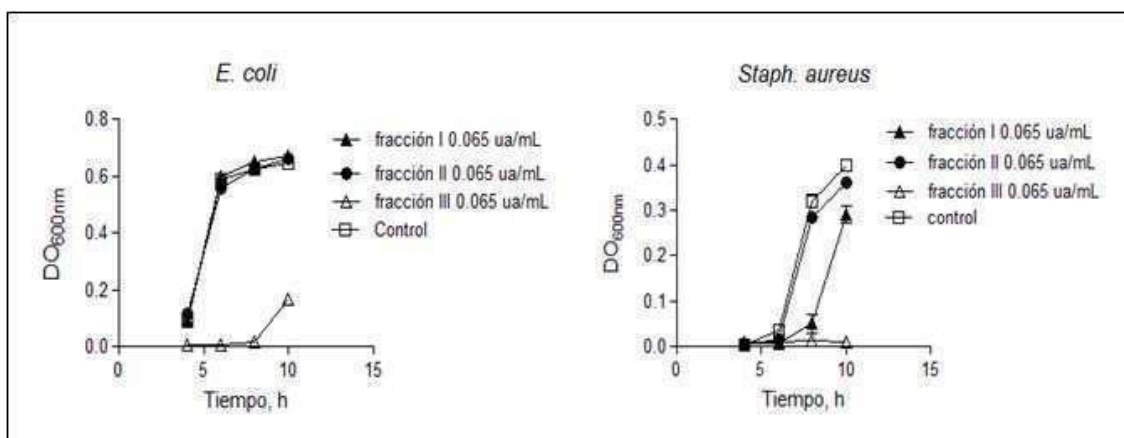


Figura 3.4.5. Actividad antimicrobiana de fracciones de cromatografía de intercambio catiónico del digerido de lactoferrina. Las tres fracciones obtenidas fueron incubadas con *Staphylococcus aureus* (A) o *Escherichia coli* (B).

Es interesante el hecho de que los péptidos presentes en la fracción I que no interactúan con la columna presentan actividad contra *Staph. aureus* pero no contra *E. coli*. También es curiosa, la observación de que el lisado completo de LF presenta mayor actividad contra *E. coli* que contra *Staph. aureus*. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que más de un dominio de la molécula de LF es requerido para inhibir a *E. coli*.

Dado que la fracción III presentaba actividad contra *Staph. aureus* y *E. coli*, se decidió continuar con la caracterización de esta fracción con el objetivo de estudiar su potencial aplicación biotecnológica. En primer lugar se estudió la complejidad de la fracción III. Para esto, la misma fue resuelta por cromatografía analítica de tamiz molecular donde se observó la presencia de un único pico (figura 3.4.6 B). Al correr esta muestra en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5 / se observó la presencia de una banda de peso molecular entre 8 y 10 kDa. Sin embargo, la misma muestra corrida en Bis-Tris-Mes-PAGE arrojó una banda de peso molecular de entre 5 y 8 kDa (figura 3.4.6 A). Por otro lado, la resolución de la fracción III en cromatografía de tamiz molecular muestra

un pico de peso molecular menor al de insulina reducida que es de 3,4 kDa (figura 3.4.6 B).

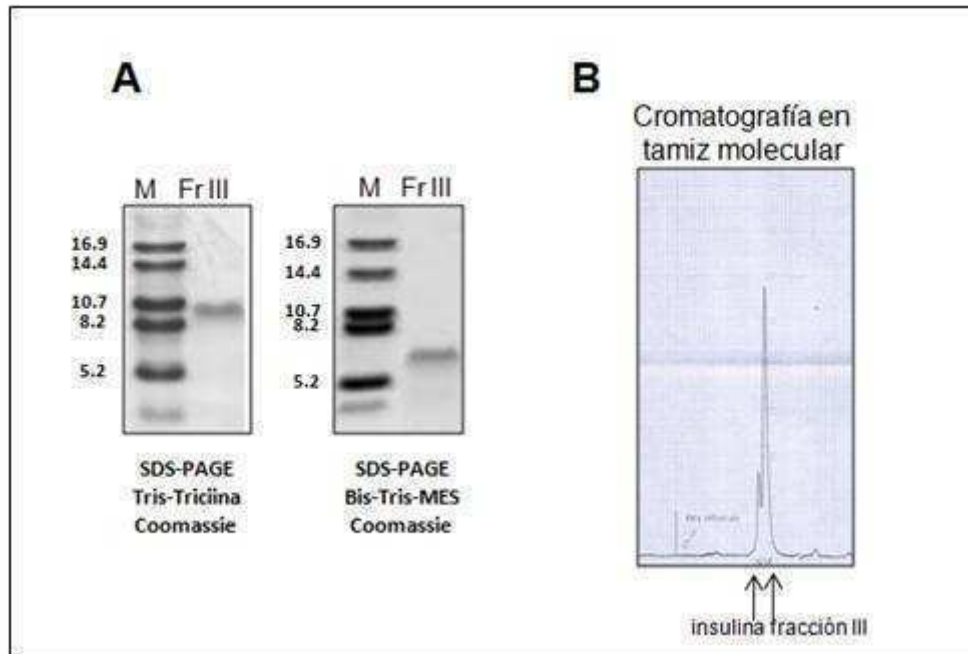


Figura 3.4.6. Caracterización de la fracción III de intercambio catiónico. A: la fracción III (Fr III) obtenida por cromatografía preparativa de intercambio catiónico de un digerido de LF fue resuelta en Tris-tricina SDS-PAGE 16,5 / y Bis-Tris-MES-SDS-PAGE para evitar la formación de aductos. B: la misma fracción fue corrida en cromatografía analítica tamiz molecular junto con insulina reducida como referencia de peso molecular.

Dado que LF se encuentra naturalmente tetra o pentaglicosilada se procedió a estudiar si la fracción III poseía este tipo de modificación postraduccional. Para esto, la fracción III fue sometida a un lectinografía (figura 3.4.7 A) y corrida en Bis-Tris-MES-SDS-PAGE revelado con el kit de detección de glicosilación Pro-Q® Emerald (Invitrogen) (figura 3.4.7 B). Ninguna de las dos metodologías reveló la presencia de residuos azúcar en la fracción III.



Figura 3.4.7. Análisis de posible glicosilación de la fracción III. **A:** análisis por lectinografía de la fracción III. BSL (lectina de *Bandeiraea simplicifolia*), ConA (concanavalina A), PSA (aglutinina de *Pisum sativum*), PNA (aglutinina de maní), DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*), RCA (aglutinina de *Ricinus cuminis*), WGA (aglutinina de germen de trigo), PHA-E (eritroaglutinina de *Phaceolus vulgaris*), SBA (aglutinina de poroto de soja), LCA (aglutinina de *Lens culinaris*). La primera y segunda calle representan respectivamente el control sin antígeno y sin lectinas. **B:** análisis de la fracción III mediante Bis-Tris-Mes SDS-PAGE y el kit Pro-Q® Emerald. En la calle 1 se corrieron LF y α -lactalbúmina como controles positivos. M: Marcador de peso molecular.

Aparentemente, la fracción III que posee actividad contra *E. coli* y *Staph. aureus* está compuesta por uno o más péptidos de naturaleza catiónica que no están glicosilados. Sin embargo se produjeron discrepancias en cuanto al peso molecular estimado para el o los péptidos de esta fracción. Con el objetivo de dirimir esta cuestión y teniendo en cuenta que la fracción III estaba compuesta por uno o muy pocos péptidos, se realizó un análisis de espectrometría de masa y secuenciación amino terminal. Este análisis fue llevado a cabo por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-Pro), (Buenos Aires, Argentina). El análisis de espectrometría de masa de la fracción III indicó que ésta estaba compuesta por dos péptidos de peso molecular 3122,9 y 3194,5 Da. La secuenciación amino terminal determinó que la secuencia de estos péptidos es

FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF difiriendo en una Ala en el amino terminal que justifica la diferencia de pesos moleculares.

El análisis de las bases de datos determinó que la secuencia hallada correspondía al péptido LFcín reportado en 1991 por Tomita *et al.*. Pese a que este péptido ya estaba descrito en la literatura se decidió explorar su potencial utilización biotecnológica para mejorar la resistencia del ganado bovino a infecciones intramamarias.

En primer lugar se exploró en mayor profundidad la actividad antimicrobiana de la fracción III sobre *Staph. aureus* y *E. coli*. En la figura 3.4.8 se muestra que la cinética de inhibición de la fracción III es muy similar en ambas bacterias mostrando una fuerte actividad bactericida inicial. Esta actividad fue distinta de la observada para concentraciones equimolares de LF.

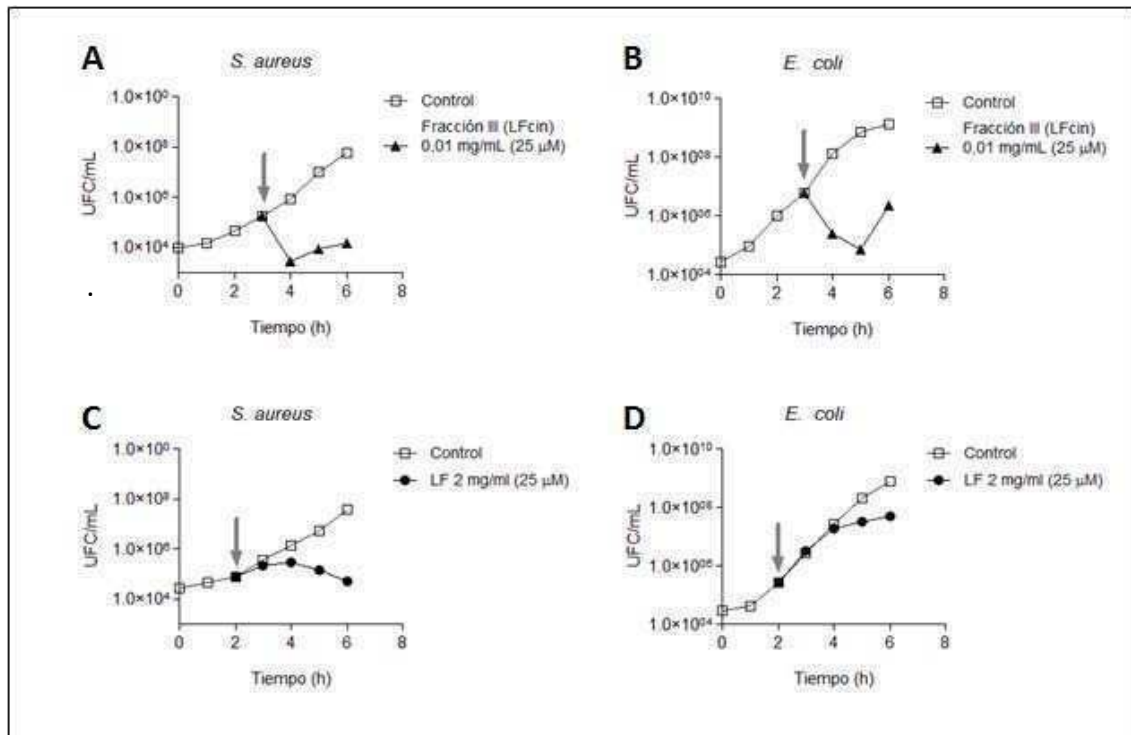


Figura 3.4.8. Actividad antimicrobiana de lactoferrina y lactoferrina. A y B: la fracción III (LFcín) obtenida en este estudio fue incubada con *Staph. aureus* y *E. coli*. C y D

efecto de LF en condiciones similares. La flecha gris indica el momento donde se agregó el péptido o la proteína correspondientes.

En trabajos anteriores se ha reportado la expresión recombinante de LF en bovinos. Sin embargo estos animales no presentaban resistencia aumentada a la infección experimental con *E. coli* (Hyvonen *et al.* 2006), aunque sí contra un patógeno menor como *Streptococcus chromogenes*. En consecuencia, se decidió analizar la expresión recombinante del péptido de la fracción III (LFcin) en células eucariotas ya que éste presenta mayor actividad antimicrobiana que la LF intacta.

La expresión recombinante de LFcin presenta desafíos particulares dado su pequeño tamaño (25 aa) y su carácter altamente catiónico (PI= 11,84). Dadas estas particularidades, se decidió evaluar la expresión de LFcin como proteína de fusión. En virtud de los hallazgos reportados en el apartado 3.3 de este trabajo de tesis, que mostraron que β -LG presentaba actividad contra patógenos causantes de mastitis, se optó por esta proteína como segundo componente de la proteína de fusión con LFcin. En la figura 3.4.9 se muestra el esquema del gen de fusión diseñado, que fue denominado *q7*. El mismo consiste en la secuencia completa de β -LG (incluyendo su péptido señal), ligada a la secuencia de 25 aminoácidos de LFcin a través de una secuencia de reconocimiento de enteroquinasa (figura 3.4.9, recuadro). El gen sintético correspondiente a esta proteína quimérica fue encargado a la compañía GenScript en el plásmido pUC-57 y reclonado en el plásmido de expresión eucariota pCX-EGFP (figura 3.4.9).

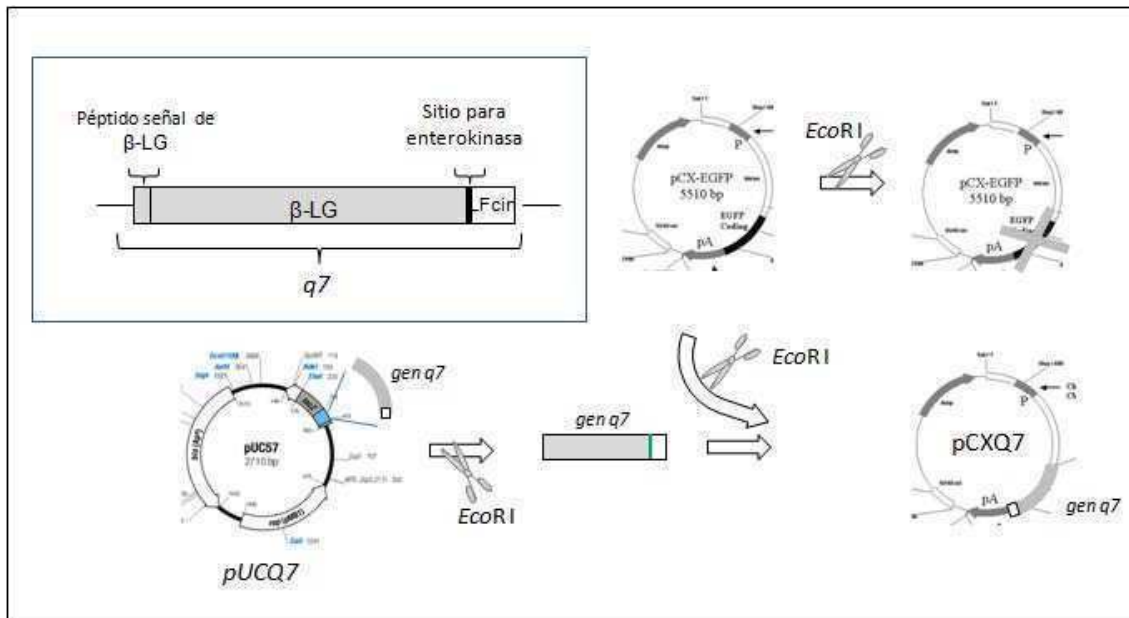


Figura 3.4.9. Esquema de la construcción del vector pCXQ para expresar la proteína quimérica Q7. El gen de fusión *q7* generado sintéticamente fue subclonado desde el vector pUCQ7 al vector pCXEGFP para dar lugar al vector pCXQ7. El vector pCX-EGFP cortado con *EcoRI* fue religado y utilizado como control negativo. En el recuadro se muestra el esquema del gen quimérico *q7* que contiene el segmento de β -LG incluyendo su péptido señal, un sitio de reconocimiento para la enzima enteroquinasa y la secuencia correspondiente a los 25 aa del péptido LFcIn.

El vector obtenido (pCXQ7) fue utilizado en experimentos de transfección estable en células CHO. La expresión de la proteína Q7 fue evaluada en las células en cultivo por inmunofluorescencia (figura 3.4.10 A) y en los correspondientes sobrenadantes por western blot (figura 3.4.10 B). En ambos casos se utilizaron anticuerpos específicos contra β -LG. Se observó que el gen de fusión se expresó dando una proteína de peso molecular de aproximadamente 23 kDa en concordancia con la presencia de β -LG, más LFcIn y el sitio de enteroquinasa. En la figura 3.4.10 C se

muestra que estos sobrenadantes presentaron actividad antimicrobiana contra *Staph. aureus* lo que indicaba que las células transfectadas eran capaces de expresar la proteína quimérica Q7 funcional.

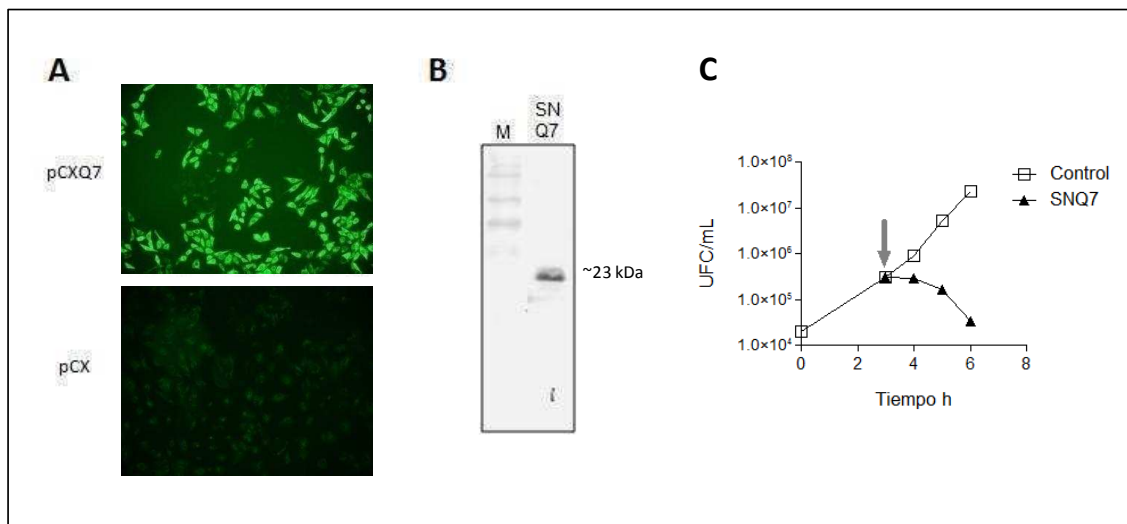


Figura 3.4.10. Análisis de la expresión de la proteína quimérica Q7. **A:** análisis por inmunofluorescencia de la expresión de la proteína Q7 en células CHO transfectadas con el vector pCXQ7 y con el vector pCX vacío. **B:** análisis por western blot de la expresión de Q7 en los sobrenadantes de cultivo de células CHO establemente transfectadas con el vector pCXQ7. **C:** actividad antimicrobiana de los sobrenadante analizados en B; la flecha indica el momento de la adición del sobrenadante.

Por último, se evaluó la actividad de Q7 purificado contra distintos patógenos causantes de mastitis. Estos ensayos perseguían la idea de evaluar la actividad específica de Q7 y compararla con la de Lfcin y β -LG. La purificación de Q7 se realizó en dos pasos mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos anti β -LG seguido de cromatografía de tamiz molecular (figura 3.4.11 A). La pureza de la proteína obtenida fue evaluada mediante SDS-PAGE teñido con plata (figura 3.4.11 B).

En la figura 3.4.11 C se observa que la proteína Q7 fue capaz de inhibir el crecimiento de *Staph. aureus* y *Strep. uberis* con una actividad específica comparable a

la de LFcín. Sin embargo Q7 no presentó actividad contra *E. coli* y *Staph. sciuri* (una bacteria del grupo ECN). Es interesante el hecho de que estos dos microorganismos resultaron sensible a LFcín y resistente a β -LG. Estos ensayos sugieren que la potencia inhibitoria de esta construcción está determinada por el segmento LFcín pero la especificidad depende de la región amino terminal β -LG.

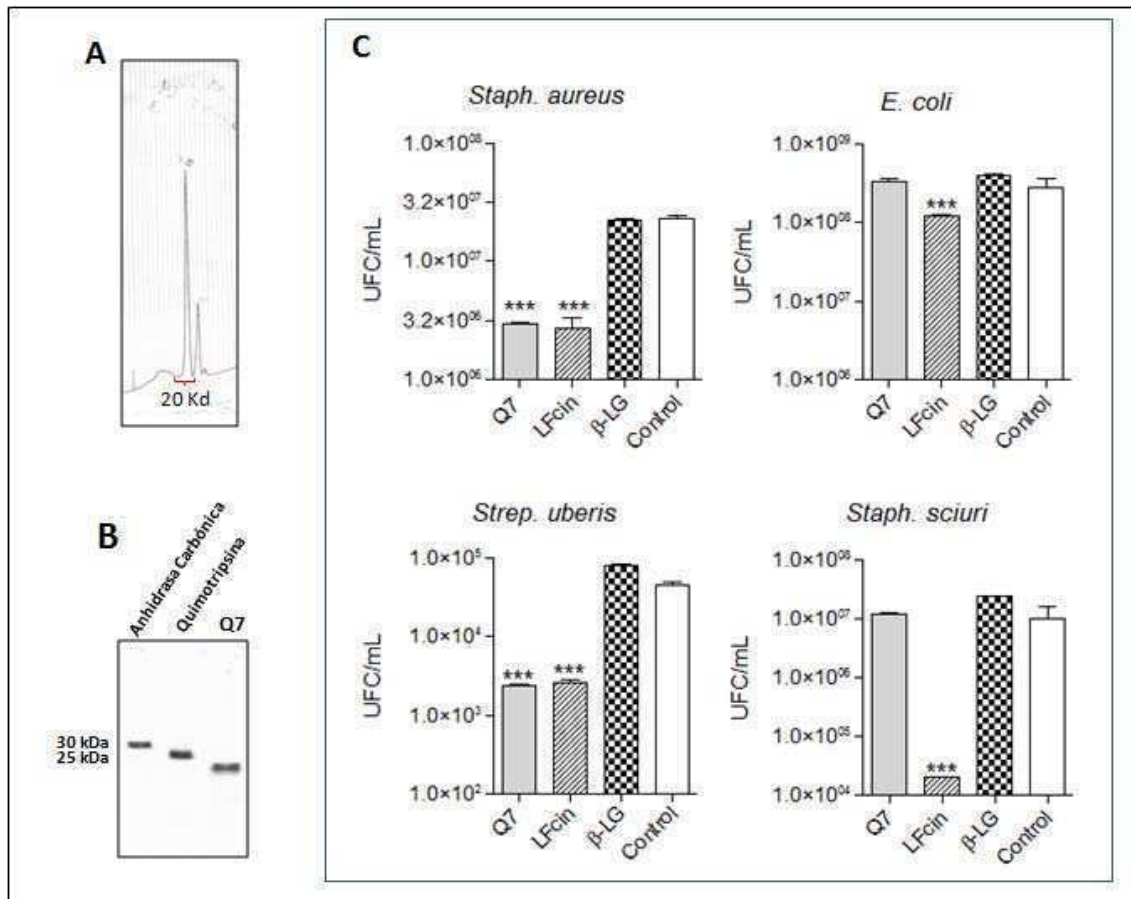


Figura 3.4.11 Purificación y análisis de la actividad de la proteína Q7. **A:** perfil de elución en cromatografía de tamiz molecular de sobrenadantes y lisados de células CHO establemente transfectadas con el vector pCXQ7 luego de haber pasado por cromatografía de afinidad. **B:** análisis de la pureza del pico obtenido en A mediante SDS-PAGE teñido con plata. **C:** análisis de la actividad antimicrobiana de la proteína Q7 contra distintas bacterias causantes de mastitis. Cada microorganismo fue incubado con 10 μ M de la proteína quimérica Q7, LFcín, β -LG o en condiciones control. Cada microorganismo fue evaluado por triplicado. Las barras representan la media \pm EEM. *** $p < 0,001$.

4. Discusión

El propósito general de este trabajo de tesis fue estudiar la relevancia de LF y otros elementos solubles en la inmunidad de la glándula mamaria bovina contra infecciones bacterianas, así como también analizar la potencial aplicación de estos factores en el diagnóstico y tratamiento de la mastitis bovina.

La sección de resultados fue organizada en 4 apartados. En el primero de ellos, se realizó un estudio inicial de los cambios en los niveles de LF al producirse una infección clínica o al hallarse la presencia de microorganismos patógenos en la glándula mamaria. El segundo apartado constituyó una extensión del primero y en él se estudiaron en mayor profundidad las variables que afectan la concentración de LF en un cuarto mamario, a la vez que se analizó el potencial uso de esta proteína como elemento diagnóstico y predictivo de la ocurrencia de mastitis. Los resultados de este segundo apartado complementan algunos de los resultados del primero y a la vez permiten una reinterpretación de los mismos. En el tercer apartado se describió una actividad antimicrobiana de β -LG nativa no reportada hasta la fecha. Por último, en el cuarto apartado de resultados se estudió la potencial aplicación biotecnológica de los hallazgos reportados en los apartados 1, 2 y 3.

4.1. Relación entre la respuesta de lactoferrina a la infección y la sensibilidad a lactoferrina por parte de patógenos causantes de mastitis

La mastitis bovina es una enfermedad típicamente multifactorial. La probabilidad de que ocurra una infección, así como la magnitud y la duración de la misma, están fuertemente determinadas por el animal que se infecta, la bacteria invasora y el medio ambiente en que ambos se encuentran (Dingwell *et al.* 2004; Elbers *et al.* 1998; Zadoks *et al.* 2001b). Como consecuencia de esto, existen marcadas diferencias geográficas en parámetros como la prevalencia, la etiología, la estacionalidad y el tipo de mastitis observadas. Estas diferencias ponen de manifiesto la necesidad de abordar el problema de la mastitis bovina desde un enfoque regional.

Los hallazgos que se presentan en el primer apartado de resultados de esta tesis (apartado 3.1.), muestran una asociación entre el aislamiento de microorganismos causantes de mastitis y la concentración de LF en esa misma muestra. Esto fue observado en cuartos mamarios que no presentaban signos evidentes de infección, lo cual indica que infecciones que no son clínicas pueden inducir cambios en la concentración de LF. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Hagiwara *et al.* 2003). Además de LF, otras proteínas como lisozima (Schmitz *et al.* 2004), defensinas (Goldammer *et al.* 2004), óxido nítrico sintasa inducible (Schmitz *et al.* 2004) y proteínas de fase aguda como haptoglobina (Eckersall *et al.* 2006) se han visto también aumentadas en infecciones clínicas y subclínicas de la glándula mamaria. Es conocido que distintos organismos patógenos despliegan diferentes estrategias de infección e inducen en consecuencia respuestas disímiles por parte de la glándula mamaria bovina (Bannerman *et al.* 2004; Wellnitz & Kerr 2004). En el presente trabajo se demostró que *Strep. uberis* es el principal responsable de la diferencia en la concentración de LF entre cuartos positivos y negativos para aislamiento microbiano. La infección clínica produjo un incremento mayor que la presencia de microorganismos patógenos sin signos clínicos, lo que es consistente con la idea de que la LF es parte de la reacción inflamatoria e inmune de la glándula mamaria bovina. Esta observación coincide con reportes previos de otros autores (Kawai *et al.* 1999; Harmon *et al.* 1975). En estos cuartos se observó también un aporte significativo de las infecciones con *Strep. uberis* al incremento en la concentración de LF. El hecho de que *Strep. uberis* esté asociado a altos niveles de LF tanto en infecciones clínicas como no clínicas es de alguna manera consistente con la clásica determinación de patógeno mayor y ambiental que ha recibido este microorganismos (ver apartado 1.3 y figura 1.4 en *introducción*).

Es interesante el hecho de que los cuartos clínicamente infectados que resultaron negativos para aislamiento microbiano presentaron altas concentraciones de LF. Estas infecciones podrían atribuirse a bacterias coliformes. Dichos microorganismos pueden desencadenar signos clínicos con cargas bacterianas muy reducidos, posiblemente mediados por la acción del LPS liberado al lisarse estas bacterias. Esta lisis explicaría al mismo tiempo la presencia de signos clínicos y la

ausencia de aislamiento microbiano (Hogan & Larry 2003). Algunos estudios previos señalan que el 30 / de los casos clínicos no resultan positivos en el aislamiento de microorganismos patógenos (Giannechini *et al.* 2002; Hoe & Ruegg 2005) y muchos de estos casos han sido atribuidos a bacterias coliformes.

Aparentemente, la glándula mamaria bovina es capaz de responder a la infección bacteriana mediante la secreción de LF. Se han descrito dos fuentes principales para esta proteína: los gránulos secundarios de los neutrófilos que ingresan a la glándula mamaria durante la infección (Paape *et al.* 2002); y la secreción del epitelio glandular inducida por la entrada de patógenos y por la reacción inflamatoria general (Molenaar *et al.* 1996; Griesbeck-Zilch *et al.* 2008). En el presente trabajo se demostró que la interacción con *Strep. uberis* es de por sí capaz de inducir la síntesis de LF *in vitro*, lo que indica que es posible una reacción directa del epitelio de la glándula mamaria a la interacción con bacterias. Harmond *et al.* (1980) demostraron que el incremento de LF durante una infección está mediado principalmente por el aumento de la secreción por células epiteliales. Por otro lado, Wellnits *et al.* (2004), hallaron, en sistemas de infección *in vitro*, que es posible inducir la síntesis de LF al tratar con *Staph. aureus* o LPS. Sin embargo, este es el primer trabajo en reportar una inducción directa de la secreción de LF mediada por *Strep. uberis*.

Las diferencias en la respuesta asociada a LF disparada por distintos patógenos podría llevar a especular que, de existir una relación causa efecto entre el agente patógeno y LF, aquellos microorganismos asociados a mayores niveles de LF deberían ser más resistentes a la acción antimicrobiana de esta proteína. En otras palabras, los microorganismos deberían estar adaptados al nicho ecológico que ellos mismos están contribuyendo a generar. Esta hipótesis fue confirmada al demostrar que *Strep. uberis* resultó resistente a la acción antimicrobiana de LF mientras que *Staph. aureus* y *E. coli* resultaron sensibles. El hecho de ser resistente a LF y de producir un aumento de esta proteína podría estar confiriéndole a *Strep. uberis* una ventaja adaptativa sobre otros microorganismos sensibles a esta proteína. En concordancia con esta idea, estudios previos han demostrado que LF puede contribuir a la adherencia e internalización de *Strep. uberis* al epitelio de la glándula mamaria bovina (Fang *et al.* 2000).

Los resultados mostrados en el primer apartado de los resultados de esta tesis sugieren que distintos patógenos inducen distintas respuestas de LF y que, aparentemente, esta respuesta diferencial está asociada a distintas sensibilidades a esta proteína.

4.2. Lactoferrina y mastitis bovina en vacas de primera lactancia

Independientemente de los hallazgos mencionados, queda claro que la respuesta de la glándula mamaria a la infección es un proceso complejo que puede depender de múltiples factores además del patógeno involucrado. Entre ellos debería considerarse, por ejemplo, el momento de la lactancia en el que ocurre la infección y la historia sanitaria del animal involucrado. En consecuencia, en el apartado 3.2 se buscó ampliar y profundizar estos resultados.

En este trabajo se encontró que un porcentaje importante de los cuartos positivos para aislamiento microbiano no registren un incremento de la concentración de las células somáticas por encima de 200.000. Numerosos factores pueden explicar esta observación. En primer lugar, algunas especies bacterianas pueden estar asociadas a respuestas inmunes menores. En segundo lugar, es posible que en los primeros días post parto, la migración de neutrófilos del torrente sanguíneo esté de alguna manera impedida y las infecciones ocurridas en este periodo no se traduzcan en grandes incrementos en el RCS. De hecho, en este trabajo se observa que la mayoría de las infecciones latentes ocurren durante el periparto. A su vez es necesario tener en cuenta que el punto de corte elegido para este estudio, si bien es recomendado por otros autores (Schukken *et al.* 2003; Pyorala 2003) tiene cierto grado de arbitrariedad. Otros puntos de corte, también propuesto, como 50.000 o 100.000 células somáticas por mililitro (Schukken *et al.* 2003), reducirían fuertemente el porcentaje de infecciones latentes registradas en este estudio.

Un 60 / de las infecciones observadas en el apartado 3.2 de esta tesis no estuvo asociado a aislamientos microbiológicos positivos. Como se ha mencionado anteriormente, otros autores han reportado que un alto porcentaje de cuartos

clínicamente infectados resultan negativos para aislamiento microbiano (Hoe & Ruegg 2005; Giannechini *et al.* 2002) y de hecho una observación similar se describe en el apartado 3.1 de esta tesis. Sin embargo, resulta interesante que esto se observe en cuartos que no presentan signos evidentes de infección, aunque las razones sean probablemente las mismas que para las infecciones clínicas microbiológicamente negativas. De cualquier manera, es necesario mencionar que de haberse tomando sólo un criterio microbiológico para determinar el estatus sanitario, la mayoría de los cuartos infectados habrían sido considerados como sanos. Este resultado pone de manifiesto en primer lugar la dificultad que reviste el diagnóstico sensible de la mastitis y en segundo lugar la importancia de utilizar criterios múltiples de clasificación para la correcta evaluación del estatus sanitario de la glándula mamaria. En el apartado 3.1 de esta tesis no se contaba con información relativa al RCS de los cuartos analizados por lo que probablemente un número importante de cuartos infectados haya sido tabulado como sano.

La distribución de cuartos infectados a lo largo de la lactancia muestra una mayor prevalencia en los primeros días posparto, prevalencia que desciende gradualmente durante toda la lactancia. Este patrón de comportamiento ha sido observado por otros autores tanto en vacas como en vaquillonas (Calvinho *et al.* 2007; Matthews *et al.* 1992; Zadoks *et al.* 2001b). En los primeros días posparto, las funciones del sistema inmune mamario aparecen impedidas (Mallard *et al.* 1998). Esto parece estar asociado con el estrés (Burton *et al.* 2005) y el desbalance energético (van Knegsel *et al.* 2007) propio de este periodo. Por otro lado, numerosos estudios sugieren que estas infecciones podrían ser contraídas durante el parto para hacerse manifiestas poco después de comenzada la lactancia (Fox 2009; Calvinho *et al.* 2007). Al analizar por separado cada uno de los tipos de infección, se encontró que la mayor diferencia a lo largo de la lactancia se registra para los cuartos con infección latente cuya prevalencia desciende abruptamente luego de los 40 días de lactancia. Esta diferencia puede deberse al impedimento inmunológico de la mama durante el parto lo que justificaría la entrada de microorganismos patógenos sin que se monte una respuesta inmune. Por otro lado, los casos de infección inespecífica permanecen relativamente constantes hasta los 160 días posparto. Este resultado

vuelve evidenciar las diferencias existentes cuando se consideran los cuartos con aislamiento microbiológico o con altos niveles de RCS. Un resultado similar se obtuvo al estudiar la frecuencia de casos clínicos en función de los días en lactancia, donde la prevalencia se mantuvo constante hasta los 120 días. Otros autores han demostrado una mayor prevalencia de infecciones clínicas en los primeros semanas de lactancia (Fox 2009). Al igual que para las vacas pluríparas analizados en el apartado 3.1, un alto porcentaje (86 /) de los casos clínicos registrados no estuvo asociado a aislamientos microbiológicos positivos.

El grupo ECN fue el patógeno más representado en este estudio. Este resultado es consistente con otros trabajos que muestran la alta prevalencia de este grupo de microorganismo en vacas primíparas (Rajala-Schultz *et al.* 2004; Fox 2009; De Vlieghe *et al.* 2009). Los ECN están recibiendo creciente atención por ser los patógenos más frecuentemente aislado en tambos con buenas condiciones sanitarias o vacas de primera parición y por inducir incrementos en el RCS (Schukken *et al.* 2009; Pyorala & Taponen 2009; Taponen & Pyorala 2009). Sin embargo, otros autores han mostrado que la presencia de ECN está asociada con una mayor producción lechera (Piepers *et al.* 2010).

En este trabajo se muestra que el incremento de LF producto de la infección intramamaria es mayor en las primeras semanas de lactancia que en etapas posteriores. Una mayor reacción inflamatoria a la infección por coliformes durante los primeros días de lactancia ha sido reportada por otros autores (Shuster *et al.* 1996). Lehtolainen *et al.* (2003), por otro lado, reportaron resultados similares con desafíos realizados por inyección intramamaria de LPS. Sin embargo, el incremento de LF en estos ensayos fue menor en el periparto que en la lactancia tardía (Hyvonen *et al.* 2010), lo cual es opuesto a los hallazgos de la presente tesis. En el presente trabajo, además, la alta frecuencia de cuartos positivos para infecciones latentes en los primeros días de lactancia sugiere que la respuesta inflamatoria a la infección es de hecho menor durante el periparto. Muchos factores pueden explicar esta discrepancia, aunque lo más probable es que ésta se deba al tipo de infección analizada. Mientras que en los trabajos de Lehtolainen *et al.* e Hyvonen *et al.* se utilizaron desafíos

experimentales con altas dosis de LPS, en el apartado 3.2 de esta tesis se estudiaron infecciones naturales, muchas de las cuales se produjeron por patógenos Gram positivos.

El hallazgo de que la respuesta de LF es superior en los primeros días de lactancia podría estar indicando que la principal función de LF es la protección de la glándula mamaria durante este periodo cuando otras funciones inmunes se encuentran impedidas. Otros autores han propuesto una idea semejante aunque basándose en la observación de que la concentración de LF en cuartos sanos es mayor durante los primeros días en lactancia (Piccinini *et al.* 2007). Numerosos autores han reportado una concentración elevada de LF en cuartos sanos durante los primeros días de lactancia. Sin embargo, esto no se observó en el apartado 3.2 del presente trabajo de tesis. Una posible explicación para esta discrepancia es el criterio utilizado para definir una infección intramamaria. Mientras que en muchos estudios únicamente se utiliza el aislamiento microbiológico como parámetro clasificatorio, en el apartado 3.2 de esta tesis se ha integrado también la información obtenida por RCS de cuartos individuales para determinar el estatus sanitario. Esta información adicional sugiere que los altos niveles de LF en los primeros días posparto registrados en otros estudios podrían deberse en gran medida a un alto porcentaje de infecciones no registradas.

El análisis de las infecciones clínicas en vacas de primera lactancia permitió observar una mayor concentración de LF, comparada con cuartos sanos o con infecciones intramamarias sin signos clínicos. Este resultado es consistente con lo observado para vacas pluríparas (ver apartado 3.1). El bajo número de infecciones clínicas observado en este estudio impidió el análisis preciso del incremento de LF a lo largo del tiempo de lactancia.

En vacas primíparas, el análisis del impacto de cada patógeno en la concentración de LF muestra un patrón distinto al observado para vacas pluríparas. Es sorprendente que *Strep. uberis* no aparezca asociado a un aumento de LF en vacas primíparas, lo cual difiere de los hallazgos del apartado 3.1. Numerosos estudios han demostrado un alto grado de heterogeneidad entre cepas de *Strep. uberis* lo cual podría explicar esta notoria divergencia de comportamiento (Zadoks *et al.* 2003a; Leigh

et al. 1990). Se ha demostrado que algunas cepas de *Strep. uberis* son capaces de infectar la glándula mamaria durante el periodo de secado o permanecer en la mama por largos periodos de tiempo durante la lactancia (Todhunter *et al.* 1995). Esto es consistente con el hallazgo de cepas predominantes de *Strep. uberis* en algunos rodeos (Zadoks *et al.* 2001a) o con los reportes de Almeida *et al.* que muestran que *Strep. uberis* es capaz de adherirse e internalizarse en el epitelio de la glándula mamaria (Almeida *et al.* 1996; Almeida *et al.* 1999; Almeida *et al.* 2006). Tomados en conjunto, estos trabajos muestran que algunas cepas de *Strep. uberis* se comportan como patógenos contagiosos. Esto es consistente con los hallazgos del apartado 3.2 de esta tesis que muestran infecciones con *Strep. uberis* no asociadas a una reacción inflamatoria. Estos aislamientos, además se encontraron en alta frecuencia en infecciones persistentes y no se vieron asociados a un incremento en las células somáticas. Sería de interés estudiar la susceptibilidad de estos aislamientos de *Strep. uberis* a LF, o su capacidad de adherencia e internalización en células epiteliales de glándula mamaria. Sin embargo estas cepas no pudieron ser recuperadas luego de la primera fase de aislamiento e identificación.

Los resultados discutidos anteriormente sugieren que la LF tiene una potencial utilización diagnóstica de la infección intramamaria. El análisis por curva de ROC confirmó esta idea, aunque se obtuvieron valores relativamente bajos de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo. Estos parámetros resultaron mejores al analizar solamente los primeros 80 días de lactancia lo que indica el mayor valor diagnóstico de LF en este periodo. Evidentemente, con respecto a esta utilización de la LF, el presente trabajo tiene un carácter preliminar y estudios adicionales serán necesarios para validar a esta molécula como elemento diagnóstico de la infección intramamaria. Sin embargo, es posible que la concentración de LF pueda ser utilizada en conjunto con otros parámetros, como el RCS o la conductividad de la leche, para obtener un diagnóstico más rápido y certero de la infección intramamaria.

El hallazgo de una relación lineal entre la concentración de LF en leche de tanque y parámetros como el RCS y el recuento de bacterias totales abre la posibilidad de utilizar a esta proteína como un posible indicador del estatus sanitario general del

tambo. El hecho de que el recuento de *Strep. agalactiae* tenga una relación negativa con la concentración de LF puede explicarse por la posible actividad antimicrobiana de esta proteína sobre dicho microorganismo. Sin embargo, ni el análisis de la concentración de LF en vacas pluríparas (apartado 3.1) ni el estudio en vacas primíparas (apartado 3.2) arrojaron cuartos positivos para *Strep. agalactiae*. Esto impidió analizar el incremento de LF asociado a esta bacteria a nivel de cuarto individual o estudiar la sensibilidad *in vitro* de este patógeno a LF.

En los apartados 3.1 y 3.2 de este trabajo se muestra que la concentración de LF aumenta con la infección bacteriana, lo que confiere a esta proteína un potencial valor diagnóstico. Sin embargo, también se ha demostrado que la LF es capaz de inhibir el crecimiento microbiano por lo que es posible que esta molécula tenga, además, una relación con la sensibilidad de un cuarto mamario a futuras infecciones. A priori, era esperable que bajos niveles de LF estén asociados con un mayor riesgo de infección, por encontrarse la glándula mamaria con menores concentraciones de este agente “protector”. Sin embargo, en este trabajo, los cuartos mamarios que van a infectarse no presentaron niveles reducidos de LF comparados con los cuartos sanos que nunca se van a infectar. Estos niveles fueron, de hecho, levemente superiores. Una posible explicación para este fenómeno es que un cuarto que está infectado en determinado momento tiene mayor probabilidad de haber estado infectado previamente, aunque no se esté detectando aislamiento microbiológico o niveles aumentados en el RCS. de Vlieghe *et al.* (2004) demostraron que cuartos con altos niveles de RCS en el periparto mantenían altos niveles durante toda la lactancia. Mientras que cuartos con bajos niveles de RCS en el periparto se mantenían siempre de esa manera. Estos autores hipotetizaron que los cuartos con altos niveles de RCS son más susceptibles a las infecciones o que acarrean infecciones crónicas desde antes del parto, lo que hace que sus niveles de RCS permanezcan constantemente altos. Cualquiera sea el caso, es posible que fenómenos similares expliquen lo observado en este trabajo. Si hay cuartos crónicos o con predisposición a infectarse, estos tenderán a tener mayores concentraciones de LF a lo largo de la lactancia. Es interesante el hecho de que en los días más próximos a la infección, anteriores o posteriores, se registre una disminución

en la concentración de LF, lo cual podría sugerir que este descenso es necesario para que ocurran infecciones naturales.

Si en efecto, un cuarto que está “destinado a infectarse” presenta niveles aumentados de LF, producto probablemente de otras infecciones no detectadas; la concentración de esta proteína podría ser de alguna manera predictiva de futuros eventos de infección intramamaria. Esta hipótesis fue evaluada mediante análisis de Kaplan-Meier que demuestran que, en efecto, los cuartos con altas concentraciones de LF en el periparto tienen mayor probabilidad de infectarse durante la lactancia que los cuartos con bajas concentraciones de esta proteína. De esta manera, parece plausible utilizar la concentración de LF como un elemento para predecir futuras infecciones. Esto sería de gran importancia para el control de la mastitis en el tambo ya que permitiría identificar y monitorear animales y cuartos “en riesgo” de padecer infecciones.

El hecho de que la presencia de infecciones en el periparto esté también vinculada con una mayor probabilidad de posteriores infecciones es esperable dada la asociación entre ambas variables. Sin embargo, es interesante que exista una asociación entre alta concentración de LF y riesgo de infección futura aún cuando se analizan solamente cuartos sanos en el periparto. Este último hecho subraya la potencial relevancia de LF como elemento predictivo de futuras infecciones.

El análisis de susceptibilidad a nivel de vaca en un tiempo determinado fue realizado mediante la comparación de cuartos sanos de vaca sana y cuartos sanos de vacas con al menos un cuarto infectado. Si el riesgo de infección está vinculado a un descenso en la concentración de LF en un tiempo muy cercano al de la infección a nivel de la vaca; éste descenso debería observarse en los otros cuartos de la misma vaca. Esta disminución no fue observada, por lo que no es posible afirmar que las bajas concentraciones de LF predispongan a un animal a las infecciones.

Ninguno de los resultados presentados en el apartado 3.2 de esta tesis sugiere que bajas concentraciones de LF son un factor predisponente para infecciones. Por el contrario; concentraciones elevadas de LF se vinculan con el riesgo de futuras

infecciones en cuartos individuales. Contrariamente a estos hallazgos, para otros factores solubles de la inmunidad innata como β -defensina, se ha identificado una relación inversa entre concentración al periparto y riesgo de mastitis (Compton *et al.* 2009).

Tomados en conjunto, estos resultados indican que la LF no tendría una función de protección de la glándula mamaria sino que sería una proteína reactiva a las infecciones. Esta idea es además consistente con las bajas concentraciones de LF en cuartos sanos durante toda la lactancia. Un comportamiento diferente sin embargo cabría esperarse durante el secado, cuando las concentraciones de LF en cuartos sanos se incrementan hasta en 2 órdenes de magnitud (Kutila *et al.* 2003). Por otro lado, la actividad de LF en la defensa de la glándula mamaria una vez producida la infección parece ser más importante en el primer tercio de la lactancia, particularmente en los primeros días posparto. Esto podría tener un valor adaptativo particular dado el impedimento en otros factores de la inmunidad típico de este periodo.

En resumen, los hallazgos detallados en el apartado 3.2 de este trabajo de tesis muestran la importancia de la LF en la defensa de la glándula mamaria durante los primeros días de infección y sugieren una posible aplicación de esta proteína en el diagnóstico y la predicción de la mastitis bovina tanto a nivel de cuarto individual como de rodeo completo. Además, el patrón de expresión de LF a lo largo del tiempo provee una línea de evidencia independiente que apoya la hipótesis de que las infecciones ocurridas en los primeros días post parto (e incluso en los últimos días de gestación) determinan, en gran medida, el estatus sanitario de la glándula mamaria a lo largo de toda la lactancia. Por último, la gran cantidad de muestras con RCS superior a 200.000 y negativas para aislamiento microbiano subrayan por un lado la importancia del uso de métodos de diagnósticos que integren el análisis de varios parámetros; y por otro, la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico.

4.3. Actividad antimicrobiana de β -lactoglobulina

Pese a ser una proteína profundamente estudiada, la función biológica de β -LG es aún tema de debate (Kontopidis *et al.* 2004). En este trabajo se reporta que la β -LG nativa posee actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos causantes de mastitis como *Strep. uberis* y *Staph. aureus* pero no contra *E. coli*. Estos microorganismos fueron elegidos para los presentes ensayos en virtud de su alta prevalencia y de la importancia de las infecciones que producen. Cierto grado de variabilidad fue observado entre los distintos aislamientos evaluados; lo cual indica la necesidad de estudios adicionales involucrando un mayor número de cepas y especies y un área geográfica más extensa.

Muchas funciones han sido propuestas para β -LG. En base a estudios de binding y a comparaciones de estructura terciaria con proteínas de función conocida, se ha propuesto que la β -LG podría funcionar como transportador de retinol y ácidos grasos de cadena larga (Perez & Calvo 1995). Se ha propuesto, también, que la β -LG podría jugar un papel en la digestión de lípidos mediante la estimulación de la actividad de la lipasa faríngea (Perez *et al.* 1992). Algunas funciones inmunes han sido también descritas para β -LG. Pellegrini *et al.* (2001), por ejemplo, reportaron que algunos péptidos derivados de la digestión triptica de β -LG presentaban actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas. Dado que la tripsina es una proteína que se encuentra en el tracto intestinal de los mamíferos, estos autores proponen un rol para la β -LG en la transferencia pasiva de inmunidad de madre a cría durante los primeros días de lactancia. Por otro lado, Owehand *et al.* (1997) demostraron que la β -LG es capaz de impedir la adhesión bacteriana a algunas proteínas intestinales, lo que podría estar indicando una función en la defensa contra infecciones gastrointestinales en mamíferos.

De los ejemplos antes mencionados, se desprende que las funciones biológicas hasta ahora propuestas para β -LG están relacionadas con la alimentación del ternero en amamantamiento; siendo estas: fuente de aminoácidos, transporte de retinol y ácidos grasos, transferencia pasiva de inmunidad, o mejora en la digestión de lípidos. A

diferencia de estas funciones, en el apartado 3.3 de esta tesis se describe un posible rol de β -LG en el propio tejido de secreción, proveyendo a la glándula mamaria de defensa antimicrobiana contra patógenos causantes de mastitis.

Se ha reportado que la β -LG amidada presenta actividad inhibitoria contra cepas de *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Pan *et al.* 2007). Sin embargo, los resultados presentados en el apartado 3.3 de esta tesis muestran actividad antimicrobiana ejercida por la proteína nativa, lo cual no tiene precedentes en la literatura. Estos resultados difieren de aquellos reportados por Pan *et al.* (2007) quienes no encontraron actividad antimicrobiana de β -LG intacta. El uso de preparaciones comerciales de β -LG por parte de estos autores, podría explicar la ausencia de actividad observada. De hecho, se han reportaron diferencias estructurales entre β -LG purificada en el laboratorio mediante técnicas suaves y no desnaturalizantes, y preparaciones comerciales de esta proteína (de Jongh *et al.* 2001).

La elucidación de los mecanismos subyacentes a la acción antimicrobiana de β -LG no fue abordada en este trabajo. Sin embargo, estudios previos con péptidos aislados de esta proteína sugieren que algunos dominios aniónicos de β -LG podrían ser responsables de la actividad observada (Pellegrini *et al.* 2001). El remplazo de aminoácidos básicos por ácidos en estos péptidos reduce su actividad específica y amplía su espectro de acción. Este hecho subraya la importancia del carácter aniónico para la actividad y especificidad de especie de estos péptidos.

La aparente importancia de los aminoácidos aniónicos para la actividad antimicrobiana de β -LG es consistente con los hallazgos presentados en este trabajo que muestran que la variante levemente más aniónica, β -LG A (PI=5,26) presenta mayor actividad antimicrobiana que la variante más catiónica, β -LG B (PI=5,34). Además de estas diferencias en PI, de Jongh *et al.* (2001) demostraron que las sustituciones aminoacídicas que distinguen ambas variantes determinan cambios en la estructura de la superficie de la molécula, lo que podría también justificar las diferencias de actividad observadas.

El hecho de que dos variantes alélicas de β -LG presenten diferente grado de actividad antimicrobiana podría implicar una asociación entre el riesgo de mastitis y el alelo presente en un determinado animal. Un estudio de Gigli *et al.* (2004) no halló asociación entre el genotipo de β -LG encontrado y el riesgo de mastitis clínica. Sin embargo, no se puede descartar que sí exista una asociación entre el genotipo de β -LG e infecciones intramamarias no clínicas.

La incubación conjunta de concentraciones fisiológicas de β -LG y LF produjo un aumento de actividad antimicrobiana contra *Staph. aureus*. Este hallazgo sugiere que ambas proteínas podrían actuar en conjunto para inhibir a este microorganismo. β -LG ha sido encontrada en altas concentraciones en el periparto (Perez *et al.* 1990), cuando otras funciones del sistema inmune están disminuidas. Además, como se ha demostrado previamente en este trabajo, la respuesta mediada por LF es superior en los primeros días de lactancia. Tomados en conjunto, estos hechos sugieren que, cooperando en la inhibición de *Staph. aureus* y complementándose en la inhibición de *Strep. uberis* y *E. coli*; β -LG y LF juegan un papel relevante en la defensa de la glándula mamaria contra las infecciones bacterianas.

4.4. Análisis de la potencial aplicación biotecnológica de péptidos derivados de lactoferrina

Como se ha mencionado previamente, la LF ha sido muchas veces considerada una molécula con potenciales aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, la capacidad de LF de inhibir el crecimiento microbiano parece variar fuertemente entre especies y aislamientos dentro de cada especie. Este hecho ha oscurecido de alguna manera el prometedor futuro de LF como agente terapéutico y nutracéutico. En el caso de la mastitis bovina, se ha demostrado cierto grado de heterogeneidad con respecto al espectro de acción de LF (Lee *et al.* 2004; Rainard 1986) aunque existen resultados alentadores que indican su posible utilización en conjunto con drogas de uso estándar, como penicilina, para el tratamiento de la infección por *Staph. aureus* (Petitclerc *et al.* 2007). La producción de LF recombinante en leche de vaca, por otro lado, no se ha

traducido en un incremento de la resistencia a infecciones experimentales por *E. coli* (Hyvonen *et al.* 2006) pero si por *Staph. chromogenes* (Simojoki *et al.* 2010). En función de los potenciales problemas que implica la aplicación biotecnológica de LF para el control de la mastitis bovina es que se ha considerado a los péptidos derivados de esta proteína como alternativas prometedoras para combatir a esta enfermedad.

Consecuentemente, en el apartado 3.4 de esta tesis se analizaron los péptidos derivados de LF y su potencial aplicación biotecnológica. Se demostró que el digerido de LF presenta mayor actividad contra *Staph. aureus* y *E. coli* que concentraciones similares de LF. Estos resultados son consistentes con aquellos previamente presentados por Tomita *et al.* (1991). En tal sentido existe un creciente cuerpo de evidencia que indica la presencia de péptidos antimicrobianos dentro de la estructura de proteínas con funciones aparentemente no relacionadas (Clare & Swaisgood 2000). Muchos de estos péptidos parecen cumplir papeles relevantes en la defensa del organismo contra infecciones, ya sea a través de la inhibición directa del agente patógeno, o de la modulación de otros componentes del sistema inmune (Epand & Vogel 1999; Hancock & Scott 2000).

En el presente trabajo, el digerido de LF presentó mayor actividad contra *E. coli* que contra *Staph. aureus*. Esto es particularmente interesante dado que se observa un comportamiento inverso cuando se trata a estos microorganismos con LF intacta. Una posible explicación para este fenómeno es que los péptidos liberados por la digestión enzimática tengan un mecanismo de acción diferente sobre estos microorganismos que la proteína completa. Esta idea ya ha sido propuesta por otros autores y es consistente con la diferencia estructural entre la forma libre o integrada a la molécula de algunos de los péptidos derivados de LF (Vogel *et al.* 2002). La separación por tamaño de los péptidos derivados de la digestión enzimática de LF arrojó también resultados interesantes. La fracción “exterior”, que contiene péptidos pequeños, sólo presentó actividad contra *Staph. aureus* mientras que la fracción interior que aparentemente contiene péptidos grandes y pequeños registró actividad contra ambos microorganismo en magnitud similar. Es interesante el hecho de que una técnica de exclusión parcial por tamaño sea capaz de disecar la actividad del digerido de LF contra

Staph. aureus y *E. coli*. Esta técnica es simple y de bajo costo y permite procesar volúmenes de digerido relativamente grandes, lo que la vuelve atractiva como primer paso para el análisis de péptidos con propiedades emergentes. La separación por punto isoeléctrico arrojó resultados de alguna manera diferentes. La fracción catiónica presentó actividad antimicrobiana a concentraciones extremadamente bajas tanto contra *Staph. aureus* como contra *E. coli*. Nuevamente *E. coli* resultó menos sensible a la actividad antimicrobiana de estos péptidos. La fracción I compuesta por péptidos no catiónicos presentó una actividad antimicrobiana parcial contra *Staph. aureus* pero no contra *E. coli*. Una vez más se encuentran en este trabajo fracciones peptídicas con actividades antimicrobianas diferenciales, lo cual refuerza la idea de que más de un péptido de LF participa en la inhibición del crecimiento de bacterias causantes de mastitis. La elección de la fracción III de intercambio catiónico para continuar con la caracterización de los péptidos antimicrobianos derivados de LF respondió al hecho de que la misma era extremadamente simple, una única banda en geles de acrilamida y un pico único en cromatografía de tamiz molecular. Además, esta fracción poseía una alta actividad específica contra *Staph. aureus* y *E. coli*, lo cual le daba un atractiva proyección como herramienta biotecnológica para el control de mastitis. Numerosos autores han reportado la presencia de péptidos pequeños catiónicos con actividad antimicrobiana derivados de la digestión enzimática de proteínas (Clare & Swaisgood 2000).

En el apartado 3.4 de esta tesis se hallaron grandes dificultades a la hora de determinar el peso molecular de la fracción III ya que se hallaron discrepancias al resolver dicha fracción en Tris-tricina SDS-PAGE y Bis-Tris-MES SDS-PAGE. Las diferencias entre estas dos técnicas pueden explicarse por la formación de oligómeros en el gel Tris-tricina SDS-PAGE que no aparecen en las condiciones reductoras particulares del Bis-Tris-MES SDS-PAGE (Hachmann & Amshey 2005). Sin embargo, esta última condición no parece evitar completamente la formación de estos oligómeros, ya que resuelve una banda de aproximadamente 6 kDa que no es consistente con el patrón de corrida obtenido en cromatografía de tamiz molecular. Estas discrepancias ilustran las dificultades que existen a la hora de caracterizar péptidos pequeños y catiónicos y los problemas asociados a la formación de oligómeros y aductos en geles

estándar de poliacrilamida. Aunque en este caso particular no haya arrojado resultados positivos, el análisis de glicosilación es un paso fundamental para caracterizar los péptidos derivados de una proteína glicosilada en 4 o 5 sitios como LF. Se ha reportado que estas modificaciones postraduccionales, si bien no alteran la actividad antimicrobiana de LF, están asociadas a la estabilidad de la proteína (van Berkel *et al.* 1995) o relacionadas con su interacción con células eucariotas o su actividad antiviral (Baker & Baker 2009).

La identidad de los péptidos que componen la fracción III fue elucidada mediante secuenciación de Edman y espectrometría de masa. Las diferencias en el peso molecular determinado por esta técnica o por métodos electroforéticos y cromatográficos ilustran los problemas existentes a la hora de analizar péptidos catiónicos pequeños y la utilidad de la espectrometría de masa para este tipo de estudio. Es interesante el hecho de que la cinética de inhibición de la fracción III (LFcin) sobre *E. coli* y *Staph. aureus* sea distinta a la de concentraciones equimolares de LF. Este resultado sugiere que la liberación del péptido LFcin de la LF completa implica cambios estructurales que determinan un mecanismo de acción diferente.

Pese a ser una molécula relativamente bien caracterizada, el mecanismo mediante el cual LFcin ejerce su actividad bactericida no ha sido del todo establecido. En este sentido, algunos autores han propuesto que la acción de LFcin contra bacterias Gram negativas está mediada por la interacción con LPS y ácido lipoteicoico y la desestabilización de la membrana externa (Vogel *et al.* 2002). Otros autores han reportado que LFcin es capaz de internalizarse en las células procariotas donde interactúa con macromoléculas cargadas negativamente como ADN, ARN y algunas proteínas (Aguilera *et al.* 1999).

Numerosas aplicaciones y sistemas de expresión han sido propuestos y demostrados para LFcin. La expresión funcional de esta molécula ha sido lograda en diversos sistemas tanto procariotas: *E. coli* (Feng *et al.* 2010), *Streptococcus thermophilus* (Renyé, Jr. & Somkuti 2008), *Photobacterium luminescens* (Tang *et al.* 2010); eucariotas inferiores: *Pichia pastoris* (Chen *et al.* 2009) y *Pichia methanolica*

(Wang *et al.* 2007) o eucariotas superiores como *Danio rerio* (pez cebra) (Lin *et al.* 2010).

Dadas las dificultades particulares que representa la expresión recombinante de un péptido pequeño y catiónico, en el apartado 3.4 de esta tesis se decidió ensayar la expresión recombinante de LFcin como proteína de fusión. Como segundo componente de esta proteína quimérica se utilizó, β -LG, cuya capacidad de inhibir el crecimiento de *Strep. uberis* y *Staph. aureus* fue descripta también en este trabajo de tesis (ver apartado 3.3). Estudios previos han demostrado la posible utilización de LFcin como proteína de fusión con LFampin para inhibir el crecimiento de *Staph. aureus* y *E. coli* (Flores-Villasenor *et al.* 2010). Sin embargo, es muy escasa la información concerniente a la expresión recombinante de LFcin en sistemas eucariotas (Zhang *et al.* 2007). Además, de acuerdo a un análisis de la literatura, no existen antecedentes previos que demuestren la expresión de LFcin funcional como proteína de fusión en un sistema de transducción estable de células de mamíferos. El hecho de que haya sido posible establecer una línea estable que produzca este péptido antimicrobiano tiene dos consecuencias importantes. La primera es que provee una fuente permanente de proteína quimérica para su posterior caracterización molecular y el estudio de su actividad microbiológica. En segundo lugar, este desarrollo sugiere que es posible generar clones de cultivos primario de fibroblastos fetales con esta construcción insertada. Estos clones podrán a su vez ser utilizadas para la generación de ganado transgénico que exprese proteínas de fusión con LFcin.

En el apartado 3.4 de esta tesis se halló que las actividades antimicrobianas específicas de LFcin y Q7 son similares. Es interesante el hecho de que mientras que LFcin presenta actividad bactericida contra *E. coli*, la proteína de fusión Q7 no muestra dicha actividad. Estos datos sugieren que la potencia antimicrobiana de la proteína de fusión Q7 está determinada por el fragmento LFcin mientras que su especificidad viene dirigida por el fragmento β -LG. Aparentemente el contexto molecular donde se encuentra LFcin determina en parte su actividad. Queda clara la necesidad de estudios adicionales con proteínas de fusión compuestas por LFcin y otras proteínas como α -lactalbúmina o caseína. Además, un estudio completo del espectro de acción de LFcin y

Q7 podría ampliar el conocimiento sobre el alcance de estos resultados y la potencial aplicación biotecnológica de los mismos.

En resumen, los resultados presentados en el apartado 3.4 de esta tesis proveen la prueba de concepto para la generación de ganado bovino transgénico capaz de expresar L_{Fcin} como proteína de fusión. Dada la alta capacidad antimicrobiana de L_{Fcin}, es de esperar que estos animales sean resistentes a infecciones bacterianas. Como se ha mencionado previamente, existen antecedentes que demuestran que es factible utilizar ganado genéticamente modificado para incrementar la resistencia a mastitis (Wall *et al.* 2005).

5. Conclusiones

Las infecciones intramamarias están asociadas a niveles aumentados de LF. En vacas pluríparas, esto se observó en cuartos positivos para aislamiento microbiano.

En animales primíparas el aumento de LF se vio asociado a cuartos positivos para aislamiento microbiano (infecciones latentes y mastitis subclínica) y en cuartos negativos con RCS mayores a 200.000 (infecciones inespecíficas). En ambos tipos de animales las infecciones clínicas se vieron asociadas a los mayores incrementos en la concentración de LF.

Distintos microorganismos inducen distintas respuestas de LF y esta respuesta parece estar vinculada a la resistencia del patógeno a la LF. Sin embargo, se observó un patrón de respuesta diferente en vacas primíparas o pluríparas.

La LF aparece como un factor relevante en la inmunidad de la glándula mamaria durante las primeras semanas de lactancia. Esto no está asociado a altas concentraciones basales de la proteína sino a un mayor incremento en sus niveles cuando se produce la infección.

La LF tiene valor diagnóstico, aunque moderado, sobre infecciones a nivel de cuarto, lo cual indica que podría ser utilizada en conjunto con otros marcadores para el diagnóstico de la mastitis bovina. Además, la LF presenta asociación con variables de estatus sanitario a nivel de tanque, por lo que podría ser utilizada para evaluar el nivel de infección general del tambo.

La LF no parece ser un factor de susceptibilidad en el sentido clásico. No se pudieron vincular reducidas concentraciones de LF con un mayor riesgo de infección. Por el contrario; altas concentraciones de LF en el periparto se vieron asociadas a un riesgo aumentado de infecciones futuras, por lo que esta proteína podría tener utilidad para detectar cuartos con alta probabilidad de infección.

Se detectó actividad antimicrobiana de β -LG contra patógenos causantes de mastitis. El espectro de actividad resultó complementario al de LF. Esto sugiere que ambas proteínas podrían actuar en conjunto en la defensa de la glándula mamaria; sobre todo en los primeros días de lactancia, donde la β -LG es más abundante y la LF más reactiva.

Los péptidos derivados de la digestión enzimática con pepsina de LF presentaron una actividad específica mayor y una cinética de inhibición diferente a la proteína nativa.

Fue posible expresar LFCin como proteína de fusión en células CHO establemente transfectadas. Esta proteína de fusión presentó actividad antimicrobiana contra *Staph. aureus* y *Strep. uberis* pero no contra *E. coli* y *Staph. sciuri*.

El desarrollo de la proteína quimérica Q7 expresada en un sistema estable constituye una prueba de concepto para la generación de ganado transgénico resistente a mastitis a través de la expresión de péptidos antimicrobianos en proteínas de fusión.



6. Referencias

- Actor, J. K., Hwang, S. A. & Kruzel, M. L. (2009) Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr.Pharm.Des*, **15**, 1956-1973.
- Aguilera, O., Ostolaza, H., Quiros, L. M. & Fierro, J. F. (1999) Permeabilizing action of an antimicrobial lactoferricin-derived peptide on bacterial and artificial membranes. *FEBS Lett.*, **462**, 273-277.
- Almeida, R. A., Fang, W. & Oliver, S. P. (1999) Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. *FEMS Microbiol.Lett.*, **177**, 313-317.
- Almeida, R. A., Luther, D. A., Kumar, S. J., Calvino, L. F., Bronze, M. S. & Oliver, S. P. (1996) Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. *Zentralbl.Veterinarmed.B*, **43**, 385-392.
- Almeida, R. A., Luther, D. A., Park, H. M. & Oliver, S. P. (2006) Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). *Vet.Microbiol.*, **115**, 183-191.
- Amand de Mendieta, V., Micheo, C., Soriano, C., Tabera, A., Stefano, A., Casasnovas, G., Purrán, P., Corradetti, A. & Carabajal, S. (2001) Aislamiento e identificación de patógenos mamarios de animales bovinos lecheros de la cuenca Mar y Sierras. *Vet.Arg.*, **18**, 499-504.
- Arnold, R. R., Russell, J. E., Champion, W. J., Brewer, M. & Gauthier, J. J. (1982) Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from the stasis of iron deprivation. *Infect.Immun.*, **35**, 792-799.
- Arnould, V. M., Soyeurt, H., Gengler, N., Colinet, F. G., Georges, M. V., Bertozzi, C., Portetelle, D. & Renaville, R. (2009) Genetic analysis of lactoferrin content in bovine milk. *J.Dairy Sci.*, **92**, 2151-2158.
- Asociación Argentina de Lucha Contra Mastitis . Estimación de las pérdidas en volumen de producción de leche provocadas por la mastitis bovina en la República Argentina. Arch. Lechería 6:73. 1983. Com. Fed. Lechería.
Ref Type: Report
- Baker, E. N. & Baker, H. M. (2009) A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, **91**, 3-10.
- Bannerman, D. D., Paape, M. J., Lee, J. W., Zhao, X., Hope, J. C. & Rainard, P. (2004) *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, **11**, 463-472.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J., Beiboer, M. L., Wilmink, H., Benedictus, G. & Brand, A. (1998) Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J.Dairy Sci.*, **81**, 411-419.

- Baumrucker, C. R., Gibson, C. A. & Schanbacher, F. L. (2003) Bovine lactoferrin binds to insulin-like growth factor-binding protein-3. *Domest.Anim Endocrinol.*, **24**, 287-303.
- Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J. & Furmanski, P. (1994) Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.*, **54**, 2310-2312.
- Bishop, J. G., Schanbacher, F. L., Ferguson, L. C. & Smith, K. L. (1976) In vitro growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin. *Infect.Immun.*, **14**, 911-918.
- Bovenhuis, H., van Arendonk, J. A. & Korver, S. (1992) Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J.Dairy Sci.*, **75**, 2549-2559.
- Bradley, A. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet.J.*, **164**, 116-128.
- Bradley, A. J. & Green, M. J. (1997) Clinical mastitis in dairy cows after 'blitz' therapy. *Vet.Rec.*, **141**, 179-180.
- Bradley, A. J. & Green, M. J. (2001) Adaptation of Escherichia coli to the bovine mammary gland. *J.Clin.Microbiol.*, **39**, 1845-1849.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J. & Leigh, L. (1972) Iron-binding proteins in milk and resistance to Escherichia coli infection in infants. *Br.Med.J.*, **1**, 69-75.
- Burton, J. L., Madsen, S. A., Chang, L. C., Weber, P. S., Buckham, K. R., van Dorp, R., Hickey, M. C. & Earley, B. (2005) Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, **105**, 197-219.
- Burvenich, C., Van, M., V, Mehrzad, J., Diez-Fraile, A. & Duchateau, L. (2003) Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet.Res.*, **34**, 521-564.
- Bussmann, U. A., Lanuza, G. M. & Bussmann, L. E. (2004) Activin and follistatin in rat mammary gland. *Mol.Cell Endocrinol.*, **221**, 9-19.
- Calvinho, L. & Tirante, L. (2005) Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Rev FAVE*, **4**, 29-40.
- Calvinho, L. F., Canavesio, V. R., Iguzquiza, I. A., Marioni, I., Puricelli, F. G., Neder, V. E., Tarabla, H. D. & Aubagna, M. D. (2007) Intramammary infections during the periparturient period in Argentine dairy heifers. *Rev.Argent Microbiol.*, **39**, 84-89.
- Chaves, J. C., Tirante, L. & Chertcoff, R. E. Prevalencia de infecciones intramamarias por *Staphylococcus aureus* en vaquillonas pre-parto. P.A-13. 2010. Cong. Nac. Cal. de Leche y Mastitis.
Ref Type: Conference Proceeding
- Chen, G. H., Chen, W. M., Huang, G. T., Chen, Y. W. & Jiang, S. T. (2009) Expression of recombinant antibacterial lactoferricin-related peptides from *Pichia pastoris* expression system. *J.Agric.Food Chem.*, **57**, 9509-9515.

- Cheng, J. B., Wang, J. Q., Bu, D. P., Liu, G. L., Zhang, C. G., Wei, H. Y., Zhou, L. Y. & Wang, J. Z. (2008) Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *J.Dairy Sci.*, **91**, 970-976.
- Chertcoff, R. L., Tirante, L., Chaves, J. C., La Manna, R. & Olivieri, R. Relevamiento de infecciones mamarias en tambos de distintas cuencas lecheras del país. 1996. Rio Cuarto, Córdoba. Cong. Nac. Cal. de Leche y Mastitis. 1996.
Ref Type: Conference Proceeding
- Clare, D. A. & Swaisgood, H. E. (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *J.Dairy Sci.*, **83**, 1187-1195.
- Compton, C. W., Cursons, R. T., Barnett, C. M. & McDougall, S. (2009) Expression of innate resistance factors in mammary secretion from periparturient dairy heifers and their association with subsequent infection status. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, **127**, 357-364.
- Cousins, C. L., Higgs, T. M., Jackson, E. R., Neave, F. K. & Dodd, F. H. (1980) Susceptibility of the bovine udder to bacterial infection in the dry period. *J.Dairy Res.*, **47**, 11-18.
- Da Silva, F. M., Burvenich, C. & Leen, A. (1998) Assessment of blood neutrophil oxidative burst activity in dairy cows during the period of parturition. *Anim.Sci.*, **67**, 421-426.
- de Jongh, H. H., Groneveld, T. & de Groot, J. (2001) Mild isolation procedure discloses new protein structural properties of beta-lactoglobulin. *J.Dairy Sci.*, **84**, 562-571.
- De Vliegheer, S., Barkema, H. W., Stryhn, H., Opsomer, G. & de Kruif, A. (2004) Impact of early lactation somatic cell count in heifers on somatic cell counts over the first lactation. *J.Dairy Sci.*, **87**, 3672-3682.
- De Vliegheer, S., Zadoks, R. N. & Barkema, H. W. (2009) Heifer and CNS mastitis. *Vet Microbiol.*, **134**, 1-2.
- Dingwell, R. T., Leslie, K. E., Schukken, Y. H., Sargeant, J. M., Timms, L. L., Duffield, T. F., Keefe, G. P., Kelton, D. F., Lissemore, K. D. & Conklin, J. (2004) Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. *Prev.Vet.Med.*, **63**, 75-89.
- Dionysius, D. A., Grieve, P. A. & Milne, J. M. (1993) Forms of lactoferrin: their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J.Dairy Sci.*, **76**, 2597-2600.
- Douglas, V. L., Fenwick, S. G., Pfeiffer, D. U., Williamson, N. B. & Holmes, C. W. (2000) Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.*, **75**, 27-41.
- Eckersall, P. D., Young, F. J., Nolan, A. M., Knight, C. H., McComb, C., Waterston, M. M., Hogarth, C. J., Scott, E. M. & Fitzpatrick, J. L. (2006) Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J.Dairy Sci.*, **89**, 1488-1501.
- Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J. & Spik, G. (1995) Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* O55B5 lipopolysaccharide. *Biochem.J.*, **312 (Pt 3)**, 839-845.

- Elbers, A. R., Miltenburg, J. D., De Lange, D., Crauwels, A. P., Barkema, H. W. & Schukken, Y. H. (1998) Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of The Netherlands. *J.Dairy Sci.*, **81**, 420-426.
- Ellison, R. T., III & Giehl, T. J. (1991) Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J.Clin.Invest*, **88**, 1080-1091.
- Ellison, R. T., III, Giehl, T. J. & LaForce, F. M. (1988) Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect.Immun.*, **56**, 2774-2781.
- Eband, R. M. & Vogel, H. J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim.Biophys.Acta*, **1462**, 11-28.
- Erskine, R., Cullor, J. S., Schaellibaum, M., Yancey, B. & Zeconi, A. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. 400-414. 2004. **NATIONAL MASTITIS COUNCIL**.
Ref Type: Report
- Fang, W., Almeida, R. A. & Oliver, S. P. (2000) Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. *Am.J.Vet.Res.*, **61**, 275-279.
- Feng, X., Liu, C., Guo, J., Bi, C., Cheng, B., Li, Z., Shan, A. & Li, Z. (2010) Expression and purification of an antimicrobial peptide, bovine lactoferricin derivative LfcinB-W10 in *Escherichia coli*. *Curr.Microbiol.*, **60**, 179-184.
- Fitzpatrick, J. L., Young, F. J., Eckersall, P. D., Logue, D. N., Knight, C. J. & Nolan, A. Recognising and controlling pain and inflammation in mastitis. 36-44. 1998. Proceedings of the British Mastitis Conference. Stoneleigh. 1998.
Ref Type: Conference Proceeding
- Flores-Villasenor, H., Canizalez-Roman, A., Reyes-Lopez, M., Nazmi, K., de la, G. M., Zazueta-Beltran, J., Leon-Sicairos, N. & Bolscher, J. G. (2010) Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFcin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biometals*, **23**, 569-578.
- Fox, L. K. (2009) Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Vet.Microbiol.*, **134**, 82-88.
- Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I. & Moreno, L. J. (2002) Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand.*, **43**, 221-230.
- Gigli, I., Maizon, D. O. & Bussmann, L. Frecuencia genotípica de Beta-Lactoglobulina en relacion con mastitis clinica. *Journal of Basic and Applied Genetics* 16, 125. 2004.
Ref Type: Conference Proceeding
- Giraudó, J., Rampone, H., Martínez, L. & Calzolari, A. (1995) Recuento de células somáticas en leche bovina de cuartos mamarios con y sin aislamiento microbiano. *Rev.Med.Vet.(Bs.As.)*, **76**, 6-10.

- Giraud, J. A., Calzolari, A., Rampone, H., Rampone, A., Giraud, A. T., Bogni, C., Larriestra, A. & Nagel, R. (1997) Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J.Dairy Sci.*, **80**, 845-853.
- Goldammer, T., Zerbe, H., Molenaar, A., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Kata, S. R. & Seyfert, H. M. (2004) Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*, **11**, 174-185.
- Gonzalez, R. N., Cullor, J. S., Jasper, D. E., Farver, T. B., Bushnell, R. B. & Oliver, M. N. (1989) Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can.J.Vet Res.*, **53**, 301-305.
- Gonzalez, R. N. & Echaide, I. E. (1983) Estudio sobre sanidad animal en el noreste argentino. VII. Mastitis clínica bovina en establecimientos lecheros del Valle de Lerma, Salta. *Rev.Med.Vet*, **64**, 24-36.
- Gordon, K., Lee, E., Vitale, J. A., Smith, A. E., Westphal, H. & Hennighausen, L. (1992) Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. 1987. *Biotechnology*, **24**, 425-428.
- Griesbeck-Zilch, B., Meyer, H. H., Kuhn, C. H., Schwerin, M. & Wellnitz, O. (2008) *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J.Dairy Sci.*, **91**, 2215-2224.
- Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Tormo-Mas, M. A., Weinert, L. A., Lowder, B. V., Cartwright, R. A., Smyth, D. S., Smyth, C. J., Lindsay, J. A., Gould, K. A., Witney, A., Hinds, J., Bollback, J. P., Rambaut, A., Penades, J. R. & Fitzgerald, J. R. (2010) Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol.Evol.*, **2**, 454-466.
- Hachmann, J. P. & Amshey, J. W. (2005) Models of protein modification in Tris-glycine and neutral pH Bis-Tris gels during electrophoresis: effect of gel pH. *Anal.Biochem.*, **342**, 237-245.
- Hagiwara, S., Kawai, K., Anri, A. & Nagahata, H. (2003) Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J.Vet.Med.Sci.*, **65**, 319-323.
- Hancock, R. E. & Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.*, **8**, 402-410.
- Hancock, R. E. & Scott, M. G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **97**, 8856-8861.
- Harmon, R. J. & Newbould, F. H. (1980) Neutrophil leukocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *Am.J.Vet.Res.*, **41**, 1603-1606.
- Harmon, R. J., Schanbacher, F. L., Ferguson, L. C. & Smith, K. L. (1975) Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *Am.J.Vet.Res.*, **36**, 1001-1007.

- Heck, J. M., Schennink, A., van Valenberg, H. J., Bovenhuis, H., Visker, M. H., van Arendonk, J. A. & van Hooijdonk, A. C. (2009) Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *J.Dairy Sci.*, **92**, 1192-1202.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G. & Steine, T. (2003) Selection responses for clinical mastitis and protein yield in two Norwegian dairy cattle selection experiments. *J.Dairy Sci.*, **86**, 2990-2999.
- Hillerton, J. E. & Berry, E. A. (2005) Treating mastitis in the cow--a tradition or an archaism. *J.Appl.Microbiol.*, **98**, 1250-1255.
- Hoe, F. G. & Ruegg, P. L. (2005) Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **227**, 1461-1468.
- Hogan, J. & Larry, S. K. (2003) Coliform mastitis. *Vet Res.*, **34**, 507-519.
- Hogan, J. S., Gonzáles, R. S., Harmon, R. J., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pankey, J. W. & Smith, K. L. (1999) Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI.
- Hortet, P. & Seegers, H. (1998) Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. *Vet.Res.*, **29**, 497-510.
- Hospido, A. & Sonesson, U. (2005) The environmental impact of mastitis: a case study of dairy herds. *Sci.Total Environ.*, **343**, 71-82.
- Hyvonen, P., Haarahiltunen, T., Lehtolainen, T., Heikkinen, J., Isomaki, R. & Pyorala, S. (2010) Concentrations of bovine lactoferrin and citrate in milk during experimental endotoxin mastitis in early- versus late-lactating dairy cows. *J.Dairy Res.*, 1-7.
- Hyvonen, P., Suojala, L., Orro, T., Haaranen, J., Simola, O., Rontved, C. & Pyorala, S. (2006) Transgenic cows that produce recombinant human lactoferrin in milk are not protected from experimental *Escherichia coli* intramammary infection. *Infect.Immun.*, **74**, 6206-6212.
- Jenssen, H. & Hancock, R. E. (2009) Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, **91**, 19-29.
- Kai, K., Komine, Y., Komine, K., Asai, K., Kuroishi, T., Kozutsumi, T., Itagaki, M., Ohta, M. & Kumagai, K. (2002) Effects of bovine lactoferrin by the intramammary infusion in cows with staphylococcal mastitis during the early non-lactating period. *J.Vet.Med.Sci.*, **64**, 873-878.
- Kanyshkova, T. G., Semenov, D. V., Buneva, V. N. & Nevinsky, G. A. (1999) Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities. *FEBS Lett.*, **451**, 235-237.
- Kawai, K., Hagiwara, S., Anri, A. & Nagahata, H. (1999) Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis. *Vet.Res.Commun.*, **23**, 391-398.
- Kemp, M. H., Nolan, A. M., Cripps, P. J. & Fitzpatrick, J. L. (2008) Animal-based measurements of the severity of mastitis in dairy cows. *Vet.Rec.*, **163**, 175-179.
- Kim, W. S., Ohashi, M., Tanaka, T., Kumura, H., Kim, G. Y., Kwon, I. K., Goh, J. S. & Shimazaki, K. (2004) Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biometals*, **17**, 279-283.

Kingwill, R. G., Neave, F. K., Dodd, F. H., Griffin, T. K., Westgarth, D. R. & Wilson, C. D. (1970) The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years. *Vet.Rec.*, **87**, 94-100.

Klaas, I. C., Enevoldsen, C., Ersboll, A. K. & Tolle, U. (2005) Cow-related risk factors for milk leakage. *J.Dairy Sci.*, **88**, 128-136.

Komine, Y., Komine, K., Kai, K., Itagaki, M., Kuroishi, T., Aso, H., Obara, Y. & Kumagai, K. (2006) Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. *J.Vet.Med.Sci.*, **68**, 205-211.

Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L. (2004) Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J.Dairy Sci.*, **87**, 785-796.

Kutilla, T., Pyorala, S., Kaartinen, L., Isomaki, R., Vahtola, K., Myllykoski, L. & Saloniemi, H. (2003) Lactoferrin and citrate concentrations at drying-off and during early mammary involution of dairy cows. *J.Vet.Med.A Physiol Pathol.Clin.Med.*, **50**, 350-353.

Kutilla, T., Suojala, L., Lehtolainen, T., Saloniemi, H., Kaartinen, L., Tahti, M., Seppala, K. & Pyorala, S. (2004) The efficacy of bovine lactoferrin in the treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, **27**, 197-202.

Kuwata, H., Yip, T. T., Tomita, M. & Hutchens, T. W. (1998) Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. *Biochim.Biophys.Acta*, **1429**, 129-141.

Lacasse, P., Lauzon, K., Diarra, M. S. & Petitclerc, D. (2007) Utilization of lactoferrin to fight antibiotic resistant mammary gland pathogens. *J.Anim Sci.*

Lacetera, N., Scalia, D., Franci, O., Bernabucci, U., Ronchi, B. & Nardone, A. (2004) Short communication: effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. *J.Dairy Sci.*, **87**, 1012-1014.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Lam, T. J., Schukken, Y. H., van Vliet, J. H., Grommers, F. J., Tielen, M. J. & Brand, A. (1997) Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *Am.J.Vet.Res.*, **58**, 17-22.

Lee, N. Y., Kawai, K., Nakamura, I., Tanaka, T., Kumura, H. & Shimazaki, K. (2004) Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. *J.Vet.Med.Sci.*, **66**, 1267-1269.

Lehtolainen, T., Suominen, S., Kutilla, T. & Pyorala, S. (2003) Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *J.Dairy Sci.*, **86**, 2327-2333.

Leigh, J. A. (1999) *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet.J.*, **157**, 225-238.

- Leigh, J. A., Field, T. R. & Williams, M. R. (1990) Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. *Res. Vet. Sci.*, **49**, 85-87.
- Leon-Sicairos, N., Lopez-Soto, F., Reyes-Lopez, M., Godinez-Vargas, D., Ordaz-Pichardo, C. & de la, G. M. (2006) Amoebicidal activity of milk, apo-lactoferrin, sigA and lysozyme. *Clin. Med. Res.*, **4**, 106-113.
- Lin, C. Y., Yang, P. H., Kao, C. L., Huang, H. I. & Tsai, H. J. (2010) Transgenic zebrafish eggs containing bactericidal peptide is a novel food supplement enhancing resistance to pathogenic infection of fish. *Fish. Shellfish. Immunol.*, **28**, 419-427.
- Liu, T., Zhang, Y. Z. & Wu, X. F. (2005) High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae. *J. Biotechnol.*, **118**, 246-256.
- Mallard, B. A., Dekkers, J. C., Ireland, M. J., Leslie, K. E., Sharif, S., Vankampen, C. L., Wagter, L. & Wilkie, B. N. (1998) Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.*, **81**, 585-595.
- Mariller, C., Benaissa, M., Hardiville, S., Breton, M., Pradelle, G., Mazurier, J. & Pierce, A. (2007) Human delta-lactoferrin is a transcription factor that enhances Skp1 (S-phase kinase-associated protein) gene expression. *FEBS J.*, **274**, 2038-2053.
- Matthews, K. R., Harmon, R. J. & Langlois, B. E. (1992) Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1835-1839.
- Matthews, K. R., Harmon, R. J. & Smith, B. A. (1990) Protective effect of *Staphylococcus chromogenes* infection against *Staphylococcus aureus* infection in the lactating bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **73**, 3457-3462.
- Mehrzad, J., Duchateau, L., Pyorala, S. & Burvenich, C. (2002) Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.*, **85**, 3268-3276.
- Molenaar, A. J., Kuys, Y. M., Davis, S. R., Wilkins, R. J., Mead, P. E. & Tweedie, J. W. (1996) Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **79**, 1198-1208.
- Neave, F. K., Dodd, F. H. & Kingwill, R. G. (1966) A method of controlling udder disease. *Vet. Rec.*, **78**, 521-523.
- Neave, F. K., Dodd, F. H., Kingwill, R. G. & Westgarth, D. R. (1969) Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J. Dairy Sci.*, **52**, 696-707.
- Nickerson, S. C. (1989) Immunological aspects of mammary involution. *J. Dairy Sci.*, **72**, 1665-1678.
- Nickerson, S. C. Role of drug therapy in mastitis control. Hill Farm Research Station. LSU AgCenter . 2002. LSU AgCenter. 10071.
Ref Type: Electronic Citation

- Nickerson, S. C., Owens, W. E. & Boddie, R. L. (1995) Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *J.Dairy Sci.*, **78**, 1607-1618.
- Nonnecke, B. J. & Smith, K. L. (1984) Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth. *J.Dairy Sci.*, **67**, 606-613.
- Ochoa, T. J. & Clearly, T. G. (2004) Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals*, **17**, 257-260.
- Oliver, S. P., Lewis, M. J., Gillespie, B. E., Dowlen, H. H., Jaenicke, E. C. & Roberts, R. K. (2003) Prepartum antibiotic treatment of heifers: milk production, milk quality and economic benefit. *J.Dairy Sci.*, **86**, 1187-1193.
- Oliver, S. P. & Mitchell, B. A. (1983) Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J.Dairy Sci.*, **66**, 1162-1166.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Skurnik, M. & Conway, P. L. (1997) Inhibition of Pathogen Adhesion by β -Lactoglobulin. *Int.Dairy Journal*, **7**, 685-692.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Dettloux, J. & Burvenich, C. (2002) Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **7**, 109-121.
- Pan, Y., Shiell, B., Wan, J., Coventry, M. J., Michalsky, W. P., Lee, A. & Roginsky, H. (2007) The molecular characterisation and antimicrobial properties of amidated bovine b-lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **17**, 1450-1459.
- Pankey, J. W., Nickerson, S. C., Boddie, R. L. & Hogan, J. S. (1985) Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. *J.Dairy Sci.*, **68**, 2684-2693.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. & Hunziker, P. (2001) Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine beta-lactoglobulin. *Biochim.Biophys.Acta*, **1526**, 131-140.
- Perez, M. D. & Calvo, M. (1995) Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *J.Dairy Sci.*, **78**, 978-988.
- Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R. & Calvo, M. (1990) Synthesis and evolution of concentration of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cow and sheep colostrum and milk throughout early lactation. *Cell Mol.Biol.*, **36**, 205-212.
- Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R. & Calvo, M. (1992) Effect of beta-lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochim.Biophys.Acta*, **1123**, 151-155.
- Petitclerc, D., Lauzon, K., Cochou, A., Ster, C., Diarra, M. S. & Lacasse, P. (2007) Efficacy of a lactoferrin-penicillin combination to treat {beta}-lactam-resistant *Staphylococcus aureus* mastitis. *J.Dairy Sci.*, **90**, 2778-2787.
- Piccinini, R., Binda, E., Belotti, M., Dapra, V. & Zecconi, A. (2007) Evaluation of milk components during whole lactation in healthy quarters. *J.Dairy Res.*, **74**, 226-232.

- Piepers, S., Opsomer, G., Barkema, H. W., de Kruif, A. & De Vliegher, S. (2010) Heifers infected with coagulase-negative staphylococci in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than noninfected heifers. *J.Dairy Sci.*, **93**, 2014-2024.
- Pol, M. & Ruegg, P. L. (2007) Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J.Dairy Sci.*, **90**, 262-273.
- Powers, J. P. & Hancock, R. E. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, **24**, 1681-1691.
- Pyorala, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet.Res.*, **34**, 565-578.
- Pyorala, S. & Taponen, S. (2009) Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet.Microbiol.*, **134**, 3-8.
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, E. N. & Jameson, G. B. (1999) Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine beta-lactoglobulin. *Protein Sci.*, **8**, 75-83.
- Rainard, P. (1986) Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Vet.Microbiol.*, **11**, 387-392.
- Rainard, P. & Riollet, C. (2003) Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. *Reprod.Nutr.Dev.*, **43**, 439-457.
- Rainard, P. & Riollet, C. (2006) Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet.Res.*, **37**, 369-400.
- Rajala-Schultz, P. J., Smith, K. L., Hogan, J. S. & Love, B. C. (2004) Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet.Microbiol.*, **102**, 33-42.
- Renye, J. A., Jr. & Somkuti, G. A. (2008) Cloning of milk-derived bioactive peptides in *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol.Lett.*, **30**, 723-730.
- Robert, A., Seegers, H. & Bareille, N. (2006) Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows--a quantitative analysis of published data. *Vet.Res.*, **37**, 25-48.
- Romano, L. A., Weidmann, P. E., Heer, G. E. & De Fenoglio, M. Z. Estudio del estado funcional de la glándula mamaria y su incidencia sobre la producción. 582-583. 1978. X Cog. Mundial de Buitría, Mexico.
Ref Type: Conference Proceeding
- Ruegg, P. L. (2009) Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *J.Anim Sci.*, **87**, 43-55.
- Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S. & Tomita, M. (1991) Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *J.Dairy Sci.*, **74**, 3724-3730.

- Sawyer, L. & Kontopidis, G. (2000) The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. *Biochim.Biophys.Acta*, **1482**, 136-148.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.*, **166**, 368-379.
- Schalm, O. W., Lasmanis, J. & Jain, N. C. (1976) Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leukocyte serum. *Am.J.Vet.Res.*, **37**, 885-890.
- Schalm, O. W. & Noorlander, D. O. (1957) Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **130**, 199-204.
- Schmitz, S., Pfaffl, M. W., Meyer, H. H. & Bruckmaier, R. M. (2004) Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. *Domest.Anim Endocrinol.*, **26**, 111-126.
- Schukken, Y. H., Gonzalez, R. N., Tikofsky, L. L., Schulte, H. F., Santisteban, C. G., Welcome, F. L., Bennett, G. J., Zurakowski, M. J. & Zadoks, R. N. (2009) CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet.Microbiol.*, **134**, 9-14.
- Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L. & Gonzalez, R. N. (2003) Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet.Res.*, **34**, 579-596.
- Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet.Res.*, **34**, 475-491.
- Shuster, D. E., Lee, E. K. & Kehrli, M. E., Jr. (1996) Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am.J.Vet.Res.*, **57**, 1569-1575.
- Simojoki, H., Hyvonen, P., Orro, T. & Pyorala, S. (2010) High concentration of human lactoferrin in milk of rHLf-transgenic cows relieves signs of bovine experimental Staphylococcus chromogenes intramammary infection. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, **136**, 265-271.
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. & Welsh, M. J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, **417**, 552-555.
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K. & DeRosa, D. (1997) Immunobiology of the mammary gland. *J.Dairy Sci.*, **80**, 1851-1865.
- Sordillo, L. M. & Streicher, K. L. (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.*, **7**, 135-146.
- Sorensen, M. & Sorensen, S. P. L. (1939) The protein in whey. *Trav.Lab.Carlsberg*, **23**, 55-99.
- Spik, G., Cheron, A., Montreuil, J. & Dolby, J. M. (1978) Bacteriostasis of a milk-sensitive strain of Escherichia coli by immunoglobulins and iron-binding proteins in association. *Immunology*, **35**, 663-671.

- Suriyasathaporn, W., Schukken, Y. H., Nielen, M. & Brand, A. (2000) Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J.Dairy Sci.*, **83**, 1248-1255.
- Sutra, L. & Poutrel, B. (1994) Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J.Med.Microbiol.*, **40**, 79-89.
- Suzuki, Y. A., Lopez, V. & Lonnerdal, B. (2005) Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol.Life Sci.*, **62**, 2560-2575.
- Takakura, N., Wakabayashi, H., Ishibashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Tamura, Y., Yamaguchi, H. & Abe, S. (2004) Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J.Med.Microbiol.*, **53**, 495-500.
- Tang, Z., Zhang, Y., Stewart, A. F., Geng, M., Tang, X., Tu, Q. & Yin, Y. (2010) High-level expression, purification and antibacterial activity of bovine lactoferricin and lactoferrampin in *Photobacterium luminescens*. *Protein Expr.Purif.*, **73**, 132-139.
- Taponen, S. & Pyorala, S. (2009) Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet.Microbiol.*, **134**, 29-36.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T. & Pyorala, S. (2009) Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J.Dairy Sci.*, **92**, 2610-2617.
- Tirante, L., Bas, D., Pol, M., Olivieri, R., Vandoni, R. & Chaves, J. C. Prevalencia y etiología de infecciones intramamarias en vacas de 38 hatos lecheros en Argentina. 122. 1998. Cong. Panam. Cont. Mast. y Cal. de Leche. Mérida, Mexico.
Ref Type: Conference Proceeding
- Todhunter, D. A., Smith, K. L. & Hogan, J. S. (1995) Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J.Dairy Sci.*, **78**, 2366-2374.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. & Kawase, K. (1991) Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J.Dairy Sci.*, **74**, 4137-4142.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Yaeshima, T. & Iwatsuki, K. (2009) Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*, **91**, 52-57.
- Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S. & Hayasawa, H. (2002) Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem.Cell Biol.*, **80**, 109-112.
- Trinidad, P., Nickerson, S. C. & Alley, T. K. (1990) Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J.Dairy Sci.*, **73**, 107-114.
- van Berkel, P. H., Geerts, M. E., van Veen, H. A., Kooiman, P. M., Pieper, F. R., de Boer, H. A. & Nuijens, J. H. (1995) Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins both bind iron and show identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibilities towards tryptic proteolysis. *Biochem.J.*, **312 (Pt 1)**, 107-114.

- van Berkel, P. H., Welling, M. M., Geerts, M., van Veen, H. A., Ravensbergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E. K., Pieper, F., Nuijens, J. H. & Nibbering, P. H. (2002) Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat.Biotechnol.*, **20**, 484-487.
- van der Kraan, M. I., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C., Bolscher, J. G. & Nieuw Amerongen, A. V. (2004) Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, **25**, 177-183.
- van der Strate, B. W., Beljaars, L., Molema, G., Harmsen, M. C. & Meijer, D. K. (2001) Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.*, **52**, 225-239.
- van Knegsel, A. T., de Vries, R. G., Meulenber, S., van den, B. H., Dijkstra, J., Kemp, B. & Parmentier, H. K. (2007) Natural antibodies related to energy balance in early lactation dairy cows. *J.Dairy Sci.*, **90**, 5490-5498.
- Vangroenweghe, F., Lamote, I. & Burvenich, C. (2005) Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest.Anim Endocrinol.*, **29**, 283-293.
- Viguiier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K. & O'Kennedy, R. (2009) Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.*, **27**, 486-493.
- Vogel, H. J., Schibli, D. J., Jing, W., Lohmeier-Vogel, E. M., Eband, R. F. & Eband, R. M. (2002) Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem.Cell Biol.*, **80**, 49-63.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N. & Hawk, H. W. (2005) Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat.Biotechnol.*, **23**, 445-451.
- Wang, H., Zhao, X. & Lu, F. (2007) Heterologous expression of bovine lactoferricin in *Pichia methanolica*. *Biochemistry (Mosc.)*, **72**, 640-643.
- Ward, P. N., Holden, M. T., Leigh, J. A., Lennard, N., Bignell, A., Barron, A., Clark, L., Quail, M. A., Woodward, J., Barrell, B. G., Egan, S. A., Field, T. R., Maskell, D., Kehoe, M., Dowson, C. G., Chanter, N., Whatmore, A. M., Bentley, S. D. & Parkhill, J. (2009) Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC.Genomics*, **10**, 54.
- Watts, J. L. (1988) Etiological agents of bovine mastitis. *Vet.Microbiol.*, **16**, 41-66.
- Wellnitz, O. & Kerr, D. E. (2004) Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, **101**, 191-202.
- Wells, S. J., Ott, S. L. & Seitzinger, A. H. (1998) Key health issues for dairy cattle--new and old. *J.Dairy Sci.*, **81**, 3029-3035.
- Welty, F. K., Smith, K. L. & Schanbacher, F. L. (1976) Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. *J.Dairy Sci.*, **59**, 224-231.
- West, B. T. (2009) Analyzing longitudinal data with the linear mixed models procedure in SPSS. *Eval.Health Prof.*, **32**, 207-228.

- Wieliczko, R. J., Williamson, J. H., Cursons, R. T., Lacy-Hulbert, S. J. & Woolford, M. W. (2002) Molecular typing of *Streptococcus uberis* strains isolated from cases of bovine mastitis. *J.Dairy Sci.*, **85**, 2149-2154.
- Woodward, W. D., Besser, T. E., Ward, A. C. & Corbeil, L. B. (1987) In vitro growth inhibition of mastitis pathogens by bovine teat skin normal flora. *Can.J.Vet.Res.*, **51**, 27-31.
- Ye, X., Yoshida, S. & Ng, T. B. (2000) Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin B and beta-lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **32**, 1143-1150.
- Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Grohn, Y. T. & Schukken, Y. H. (2001a) Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J.Dairy Sci.*, **84**, 590-599.
- Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Wellenberg, G. J., Grohn, Y. T. & Schukken, Y. H. (2001b) Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *J.Dairy Sci.*, **84**, 2649-2663.
- Zadoks, R. N. & Fitzpatrick, R. N. (2009) Changing trends in mastitis. *Irish Vet.Jour.*, **62**, 59-70.
- Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P. & Schukken, Y. H. (2003b) Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol.Infect.*, **130**, 335-349.
- Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P. & Schukken, Y. H. (2003a) Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiol.Infect.*, **130**, 335-349.
- Zhang, J. X., Zhang, S. F., Wang, T. D., Guo, X. J. & Hu, R. L. (2007) Mammary gland expression of antibacterial peptide genes to inhibit bacterial pathogens causing mastitis. *J.Dairy Sci.*, **90**, 5218-5225.
- Zhao, X. & Lacasse, P. (2008) Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J.Anim Sci.*, **86**, 57-65.
- Zimecki, M., Artym, J., Kocieba, M., Weber-Dabrowska, B., Lusiak-Szelachowska, M. & Gorski, A. (2008) The concerted action of lactoferrin and bacteriophages in the clearance of bacteria in sublethally infected mice. *Postepy Hig.Med.Dosw.(Online.)*, **62**, 42-46.