

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“Desarrollo de un inmunógeno multicomponente
prototípico para el control de infecciones causadas por
Staphylococcus aureus”**

Autora: Lic. Nazarena Pujato

Director: Dr. Iván S. Marcipar

Co-director: Dr. Luis F. Calvino

Laboratorio de Tecnología Inmunológica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2015-

a mis padres...

Agradecimientos...

“Y así resultó que sólo una vida similar a la vida de aquellos que nos rodean, fusionándose con ella en armonía, es una vida genuina, y que una felicidad no compartida no es felicidad.”

(Alexander Supertramp, en “Into the Wild”)

Agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL por admitirme en sus instalaciones para la realización de la carrera de doctorado en Ciencias Biológicas. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científico Técnicas por beneficiarme con las becas de posgrado, sin las cuales no me hubiese sido posible llevar a cabo el doctorado.

Debo agradecer además a muchas personas. En primer lugar al Dr. Iván Marcipar, no sólo por su dirección en esta tesis, sino por haber confiado en mí desde mis comienzos en el laboratorio de Tecnología Inmunológica. Me permitió desenvolverse con independencia en mi trabajo, considerando mis opiniones y sacando de mí más de lo que yo creía que podía dar. Gracias por darme confianza en mí misma y ayudarme a convertirme en la profesional que soy hoy. Pero además, gracias por estar siempre a la altura de nosotros (becarios, tesinitas, pasantes...), por compartir como compañero los almuerzos, charlas, anécdotas y risas. Y gracias fundamentalmente por entendernos cuando nos poníamos de humores extraños a causa de los benditos experimentos que no daban, siempre tenías tu visión optimista que nos devolvía una sonrisa y ganas de seguir intentando.

A mi co-director, Dr. Luis Calvino, quién además es responsable de la formación del grupo interdisciplinario de investigación en mastitis INTA-UNL-CONICET se mantuvo siempre comprometido con mi trabajo y dispuesto a responder mis consultas, dándome respuestas prácticas inmediatas. Le agradezco por la posibilidad que me brindó para realizar los ensayos en bovinos, los cuales no estaban planteados desde un comienzo en esta tesis, poniendo a mi disposición los animales e instalaciones del INTA de Rafaela. El trabajo cooperativo con cada uno de los integrantes del grupo, no sólo enriqueció los ensayos desarrollados en el presente trabajo, sino que me permitieron relacionarme con excelentes profesionales, pero lo más importante...excelentes personas. Quiero agradecer particularmente a la Dra. María Sol Renna, que llevó a cabo los ensayos de adherencia e internalización de bacterias a células MAC-T, con todas las dificultades que dichas evaluaciones implican. Gracias Sol por tu paciencia y constancia!

Un agradecimiento enorme y muy especial a la Dra. Cecilia Camussone, con quien trabajamos en conjunto y de quién recibí un apoyo incondicional durante todos estos años. Tener una compañera de proyecto como ella hizo más fácil sobrellevar las dificultades siempre presentes durante el desarrollo de un trabajo doctoral. Sin duda esta tesis es lo que es, en gran parte gracias a ella. Un placer haber compartido el trabajo con vos. Muchas Gracias Ceci!

No me alcanzan las palabras para dar gracias a mis compañeros de laboratorio y los que se hicieron un lugar entre nosotros, los que están y los que estuvieron: Meli, Xio, Ivancita, Pola, Rodri, Anto, Nati,

Tweety, Ger, Ivancito, Bruno, Migue, Gabi, Belén, Flor y Dai. Aparte del trabajo, compartimos tantos momentos inolvidables que hicieron más fácil el día a día, y ahora hacen más difícil llegar a este final y dejarlos ir. Gracias por escucharme, por alentarme a seguir, por hacerme reír en esos momentos frustrantes, en los que sólo se quiere tirar la placa de ELISA o el gel por la ventana!... por hacer que ir al laboratorio sea también una oportunidad para disfrutar entre amigos. Los quiero a todos! Agradezco además a las Dra. Carolina Veaute y Cristina Diez por la predisposición para responder mis dudas y por ayudarme desinteresadamente en mi trabajo. Pero más allá de los aportes laborales de ambas, agradezco a Caro y Cris...ellas estuvieron también en la diaria del lab, compartiendo los loreríos que se armaban cuando nos sentábamos a la mesa todos juntos para almorzar, fueron parte de la comisión del día dulce, gestionaron el Papá Noel invisible...siempre poniéndole buena onda a la rutina, gracias por ser parte de tantos recuerdos lindos que me llevo del lab.

Gracias a las Dras. Ma. Inés García y Adriana Soutullo por haberme permitido acceder al laboratorio de Inmunología y por su buena predisposición a atender mis consultas, grandes personas en todo sentido.

Un agradecimiento muy especial a mis padres, por haberme inculcado el gran valor que tiene estudiar y especializarse, por haberme enseñado que hay una sólo manera de hacer las cosas y es con responsabilidad, dedicación, esfuerzo y perseverancia... “lo importante no es a dónde se llega, sino cómo se llega”. Gracias a mi hermano, Estani, porque a lo largo de toda mi vida siempre estuvo a la par de mis padres brindadome su apoyo incondicional e incentivandome en los momentos de debilidad. Gracias a los tres por creer en mi... Por ustedes hoy llego más lejos de lo que alguna vez imaginé! Simplemento los adoro!

Mane y Giuli, mis hermanitas de corazón, y Caro...Gracias, porque a lo largo de esta tesis las tres me bancaron con nervios, cansancio, preocupaciones, caras largas y mucha locura, pero siempre me entendieron, se preocuparon e interesaron por mí. Es simple, gracias por no sólo estar en mi vida, sino por haber elegido ser parte de ella. Gracias por ser esa parte de mi familia que pocos entienden (y saben a lo que me refiero). Las quiero!

A mis amigas de la vida, por estar siempre cerca de mí y darme su apoyo incondicional. ...gracias por haberme enseñado que lo importante no es QUÉ se tiene, sino a QUIÉNES se tiene...Gracias amigas porque las tuve ahí conmigo durante estos años y durante la vida!

Finalmente doy gracias a mi marido: Gracias Iva por conocerme tanto y entenderme tanto, por ser mi pilar y mi luz... Gracias por ser incondicional apoyando mis elecciones y dándome la libertad de

seguir mis aspiraciones. Gracias por ser lo simple en mi complejidad. Gracias por mirarme cada día con una sonrisa que me recuerda que eso es todo lo que quiero...felicidad...

Gracias a todos y cada uno de ustedes, porque...

“La felicidad sólo es real cuando se comparte...”

(“Trapman, Into the wild”).

Índice

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 9 |
| <u>CAPÍTULO I: Introducción a la mastitis bovina causada por <i>S. aureus</i></u> | 12 |
| I-1. MASTITIS BOVINA | 13 |
| I-1-1. Formas de mastitis..... | 13 |
| I-1-2. Susceptibilidad a la mastitis bovina | 15 |
| I-1-3. Mastitis bovina causada por <i>S. aureus</i> | 16 |
| I-2. INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA | 17 |
| I-2-1. Anatomía de la glándula mamaria bovina..... | 17 |
| I-2-2. Mecanismos de defensa de la glándula | 18 |
| I-2-2-1. Defensas anatómicas..... | 19 |
| I-2-2-2. Defensas celulares..... | 19 |
| <i>Células endoteliales mamarias (MEC)</i> | 20 |
| <i>Macrófagos</i> | 20 |
| <i>Neutrófilos</i> | 21 |
| <i>Células asesinas naturales (NK)</i> | 22 |
| <i>Linfocitos T y B</i> | 22 |
| I-2-2-3. Defensas solubles | 23 |
| <i>Inmunoglobulinas</i> | 23 |
| <i>Complemento</i> | 26 |
| <i>Citoquinas</i> | 26 |
| <i>Otras proteínas</i> | 28 |
| I-3. FACTORES Y MECANISMOS DE VIRULENCIA DE <i>S. AUREUS</i> | 29 |
| I-3-1. Proteínas adhesinas | 29 |
| I-3-2. Proteína A (SpA)..... | 30 |
| I-3-3. Exotoxinas..... | 31 |
| I-3-4. PTSAgs (Pyrogenic Toxin Superantigens) | 32 |
| I-3-5. Endotoxinas | 32 |
| I-3-6. Otras Exoenzimas..... | 33 |
| I-3-7. Polisacárido capsular | 33 |

| | |
|--|-----------|
| I-3-8. Sistema Isd (iron surface determinants) | 34 |
| I-4. DESARROLLO DE MASTITIS EN BOVINOS..... | 35 |
| I-4-1. Invasión del pezón | 35 |
| I-4-2. Establecimiento de la enfermedad e inflamación | 35 |
| I-4-3. Destrucción del tejido alveolar | 37 |
| I-5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA MASTITIS BOVINA | 38 |
| I-5-1. Medidas de control | 38 |
| I-5-2. Vacunas..... | 39 |
| I-5-2-1. Vacunas a subunidades | 41 |
| I-6. HIPÓTESIS DE TRABAJO | 43 |
| I-7. OBJETIVOS..... | 44 |
| I-7-1. Objetivo general | 44 |
| I-7-2. Objetivos específicos | 44 |
| <u>CAPÍTULO II: Desarrollo de conjugados polisacárido- proteína basados en CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i>.....</u> | 45 |
| II-1. INTRODUCCIÓN..... | 46 |
| II-1-1. Serotipos capsulares CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> | 46 |
| II-1-2. Rol de CP5 y CP8 en la virulencia de <i>S. aureus</i> | 48 |
| II-1-3. Vacunas basadas en polisacáridos capsulares | 49 |
| II-1-4. Técnicas de conjugación | 50 |
| II-2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 52 |
| II-2-1. Obtención de los polisacáridos CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> | 52 |
| II-2-1-1. Cepas de <i>S. aureus</i> | 52 |
| II-2-1-2. Extracción de los polisacáridos CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> | 52 |
| II-2-1-3. Purificación de los polisacáridos CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> | 52 |
| II-2-2. Conjugación de CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> a ASH, empleando la técnica de la PBQ. | 53 |
| II-2-2-1. Caracterización electroforética (SDS-PAGE) de los conjugados obtenidos | 54 |
| II-2-2-2. Inmunodetección de las moléculas conjugadas..... | 54 |
| II-2-2-3. Espectrofotometría UV-visible..... | 55 |
| II-2-2-4. Determinación de la composición de los conjugados..... | 55 |
| II-2-3. Evaluación de la respuesta humoral generada por el conjugado CP5-ASH _{PBQ} | 56 |
| II-2-3-1. Inmunización de ratones y toma de muestras de suero | 56 |
| II-2-3-2. Desafío de los animales con CP5 nativo..... | 56 |
| II-2-3-3. Cinética de la respuesta de IgG _{total} e IgM..... | 57 |
| II-2-3-4. Determinación de los títulos de IgG _{total} por ELISA..... | 57 |
| II-2-3-5. Determinación de isotipos IgG ₁ , IgG _{2a} e IgG _{2b} | 57 |

| | |
|---|-----------|
| II-2-3-6. Análisis estadísticos | 57 |
| II-3. RESULTADOS | 59 |
| II-3-1. Obtención de los polisacáridos CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> | 59 |
| II-3-2. Conjugación de CP5 y CP8 de <i>S. aureus</i> a ASH empleando la técnica de la PBQ. | 59 |
| II-3-2-1. Caracterización electroforética (SDS-PAGE) | 59 |
| II-3-2-2. Inmunodetección de las moléculas conjugadas..... | 60 |
| II-3-2-3. Espectrometría UV-Vis..... | 61 |
| II-3-2-4. Determinación de la composición de los conjugados | 62 |
| II-3-3. Evaluación de la respuesta humoral generada por el conjugado CP5-ASH _{PBQ} | 62 |
| II-3-3-1. Análisis de las cinéticas de IgG _{total} e IgM | 62 |
| II-3-3-2. Evaluación de la respuesta humoral de memoria | 65 |
| II-3-3-3. Subclases de IgG | 66 |
| II-4. DISCUSIÓN | 67 |
| II-5. CONCLUSIONES PARCIALES..... | 71 |
| CAPÍTULO III: Producción de proteínas bacterianas recombinantes: rFnBP, rClf, rAtox, rBtox y rIsdH.. | 72 |
| III-1. INTRODUCCIÓN..... | 73 |
| III-1-1. Proteínas de adhesión de <i>S. aureus</i> | 73 |
| III-1-1-1. Factor de agregación A: Clf A..... | 74 |
| III-1-1-2. Proteína de unión a fibronectina | 76 |
| III-1-2. Determinante H de superficie regulado por hierro (<i>iron-regulated surface determinant H</i>): IsdH..... | 77 |
| III-1-3. Toxinas..... | 80 |
| III-1-3-1. Toxina alfa (Atox)..... | 80 |
| III-1-3-2. Toxina beta (Btox) | 83 |
| III-2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 86 |
| III-2-1. Obtención de las secuencias codificantes para ClfA y FnBPA..... | 86 |
| III-2-1-1. Cepas de <i>S. aureus</i> | 86 |
| III-2-1-2. Purificación del ADN genómico de <i>S. aureus</i> | 86 |
| III-2-1-3. Reacción de PCR para obtener Atox, ClfA, FnBPA o IsdH | 86 |
| III-2-1-4. Análisis de los productos de amplificación | 87 |
| III-2-1-5. Purificación de los fragmentos amplificados | 88 |
| III-2-2. Clonado de Atox, Clf40, FnBPD1-3, IsdHN1-2 | 88 |
| III-2-2-1. Cepas bacterianas empleadas | 88 |
| III-2-2-2. Vectores Plasmídicos | 88 |
| III-2-2-3. Minipreparación del ADN plasmídico | 89 |

| | |
|--|------------|
| III-2-2-4. Subclonado de Atox, Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2 en el vector pGEM T-easy | 89 |
| III-2-2-5. Digestión con enzimas de restricción | 89 |
| III-2-2-6. Clonado de los fragmentos Atox, Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2 en el vector pET32-a .. | 89 |
| III-2-3. Producción de las proteínas recombinantes | 90 |
| III-2-3-1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes | 90 |
| III-2-3-2. Purificación de las proteínas recombinantes. | 91 |
| III-2-3-3. Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas | 91 |
| III-2-4. Evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes | 92 |
| III-2-4-1. Inmunización de ratones y toma de muestras | 92 |
| III-2-4-2. Medición de anticuerpos mediante ensayos de ELISA | 92 |
| III-2-5. Análisis de la especificidad de los anticuerpos mediante ensayos de Western blot | 93 |
| III-2-5-1. Obtención de la nBtox | 93 |
| <i>Selección de una cepa de S. aureus productora de Btox</i> | 93 |
| <i>Extracción de la nBtox</i> | 93 |
| III-2-5-2. Tratamiento de las proteínas recombinantes con enteroquinasa | 94 |
| III-2-5-3. Obtención de un extracto de <i>E. coli</i> | 94 |
| III-2-5-4. Ensayo de Western Blot | 94 |
| III-3. RESULTADOS | 95 |
| III-3-1. Obtención de las secuencias codificantes para Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2 | 95 |
| III-3-2. Producción de las proteínas recombinantes | 96 |
| III-3-2-1. Producción de rClf, rFnBP e rIsdH | 96 |
| III-3-2-2. Producción de rBtox | 98 |
| III-3-2-3. Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas | 99 |
| III-3-3. Evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas obtenidas | 100 |
| III-3-3-1. Medición de anticuerpos mediante ensayos de ELISA | 100 |
| III-3-3-2. Análisis de la especificidad de los anticuerpos mediante ensayos de Western Blot .. | 101 |
| III-4. DISCUSIÓN | 103 |
| III-5. CONCLUSIONES PARCIALES | 107 |
| CAPÍTULO IV: Evaluación de la respuesta humoral generada en vaquillonas por formulaciones multicomponentes basadas en antígenos de <i>S. aureus</i> | 108 |
| IV-I. INTRODUCCIÓN | 109 |
| IV-2. MATERIALES Y MÉTODOS | 114 |
| IV-2-1. Preparación de las formulaciones de inmunización | 114 |
| IV-2-1-1. Preparación del inmunógeno VacR1 | 114 |
| IV-2-1-2. Preparación del inmunógeno VacR258. | 114 |

| | |
|---|------------|
| IV-2 -1-3. Preparación de la formulación control | 114 |
| IV-2-2. Inmunización de bovinos | 115 |
| IV-2-2-1. Animales..... | 115 |
| IV-2-2-2. Protocolo de inmunización y muestreo..... | 115 |
| IV-2-2-3. Control de sanidad animal. Análisis bacteriológico de leche..... | 116 |
| IV-2-3. Determinación de anticuerpos en muestras de suero y leche | 117 |
| IV-2-3-1. Cinética de producción de IgG _{total} | 117 |
| IV-2-3-2. Titulación de IgG _{total} e IgG ₂ en sangre | 117 |
| IV-2-3-3. Determinación de las subclases IgG ₁ e IgG ₂ en leche | 118 |
| IV-2-4-Evaluación funcional de los anticuerpos | 118 |
| IV-2-4-1. Inhibición de la actividad hemolítica de la nBtox por los anticuerpos séricos. | 118 |
| <i>Purificación de la nBtox.....</i> | <i>118</i> |
| <i>Aislamiento de glóbulos rojos de carnero</i> | <i>118</i> |
| <i>Ensayo de inhibición de la hemólisis.....</i> | <i>119</i> |
| IV-2-4-2. Inhibición de la adherencia de <i>S. aureus</i> a fibrinógeno (Fg) mediada por los anticuerpos séricos. | 119 |
| <i>Purificación de fibrinógeno a partir de plasma bovino.....</i> | <i>119</i> |
| <i>Preparación de una bacterina de S. aureus.....</i> | <i>120</i> |
| <i>Ensayo de unión a Fg.....</i> | <i>120</i> |
| IV-2-4-3. Inhibición de la adherencia de <i>S. aureus</i> a fibronectina (Fn) mediada por los anticuerpos séricos. | 120 |
| <i>Preparación de una bacterina de S. aureus.....</i> | <i>120</i> |
| <i>Preparación de un suero anti-bacterina.....</i> | <i>120</i> |
| <i>Purificación de los anticuerpos anti-rFnBP a partir de los sueros VacR258.....</i> | <i>121</i> |
| <i>Ensayo de unión a Fn.....</i> | <i>121</i> |
| IV-2-4-4. Ensayo de opsonofagocitosis de <i>S. aureus</i> por PMN bovinos..... | 121 |
| <i>Preparación de bacterias marcadas.....</i> | <i>122</i> |
| <i>Obtención de neutrófilos bovinos.....</i> | <i>122</i> |
| <i>Ensayo de fagocitosis.....</i> | <i>122</i> |
| <i>Citometría de flujo</i> | <i>123</i> |
| IV-2-4-5. Inhibición de la invasión de células epiteliales mamarias bovinas por <i>S. aureus</i> | 123 |
| <i>Preparación de las bacterias.....</i> | <i>123</i> |
| <i>Cultivo de células epiteliales mamarias bovinas</i> | <i>123</i> |
| <i>Ensayo de adherencia e internalización</i> | <i>123</i> |
| IV-2-7. Análisis estadísticos | 124 |

| | |
|---|-------------------|
| IV-3.RESULTADOS..... | 125 |
| IV-3-1. Evaluación de la respuesta humoral en suero. | 125 |
| IV-3-1-1. Cinética de producción de IgG _{total} | 125 |
| IV-3-1-2. Titulación de IgG _{total} e IgG ₂ | 128 |
| IV-3-2. Evaluación de la respuesta humoral en leche..... | 129 |
| IV-3-2-1. Cinética de producción de IgG _{total} | 129 |
| IV-3-2-2. Titulación de IgG _{total} | 132 |
| IV-3-2-3. Determinación de IgG ₁ e IgG ₂ | 133 |
| IV-3-3. Evaluación funcional de los anticuerpos..... | 134 |
| IV-3-3-1. Inhibición de la actividad hemolítica de la nBtox | 135 |
| IV-3-3-2. Inhibición de la adherencia de <i>S. aureus</i> a Fg..... | 136 |
| IV-3-3-3. Inhibición de la adherencia de <i>S. aureus</i> a Fn..... | 137 |
| IV-3-3-4. Capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos séricos..... | 138 |
| IV-3-3-5. Inhibición de la invasión de células epiteliales mamarias bovinas | 139 |
| IV-4. DISCUSIÓN | 141 |
| IV-5. CONCLUSIONES PARCIALES..... | 148 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 149 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 152 |
| <u>APÉNDICE I: Información y análisis complementarios.....</u> | <u>172</u> |
| AI-1. TÉCNICAS DE CONJUGACIÓN DE POLISACÁRIDOS A PROTEÍNAS | 173 |
| AI-1-1. Mecanismos de reacción | 173 |
| AI-1-1-1. Aminación reductiva | 173 |
| AI-1-1-2. Conjugación con Cistamina y SPDP..... | 173 |
| AI-1-1-3. Técnica del CDAP..... | 173 |
| AI-1-2. Antecedentes en el desarrollo de conjugados empleando las técnicas previamente descriptas..... | 174 |
| AI-2. CONTROL DE TRANSFERENCIA DE CP5 Y CP8 A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA | 176 |
| AI-3. EXTRACCIÓN DE Btox NATIVA A PARTIR DE <i>S. aureus</i> | 177 |
| AI-3-1. Selección de una cepa productora de Btox..... | 177 |
| AI-3-2. Control de la purificación de la Btox nativa | 177 |
| AI-4. CONTROL DE LA PURIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO A PARTIR DE PLASMA BOVINO..... | 178 |
| AI-5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A Clf40 | 179 |
| AI-5-1- Secuencia a amplificar por PCR | 179 |
| AI-5-2. Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy. | 180 |

| | |
|---|------------|
| AI-6. ANÁLISIS DE SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A FnBPD1-3..... | 182 |
| AI-6-1.Secuencia a amplificar por PCR | 182 |
| AI-6-2.Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy. | 183 |
| AI-7. SECUENCIA CORRESPONDIENTE A IsdHN1-2. | 185 |
| AI-7-1. Secuencia a amplificar por PCR..... | 185 |
| AI-7-2. Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy. | 185 |
| AI-8.SECUENCIA CORRESPONDIENTE A Atox..... | 188 |
| AI-8-1.Secuencia a amplificar por PCR | 188 |
| AI-8-2.Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy. | 188 |
| <u>APÉNDICE II: Soluciones y medios</u>..... | 190 |
| <u>APÉNDICE III: Publicaciones científicas realizadas</u>..... | 197 |

Abreviaturas

aa: aminoácidos

ACF: Adyuvante completo de Freund

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

APC: célula presentadora de antígeno

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASB: albúmina sérica bovina

ASH: albúmina sérica humana

Atox: alfa toxina

ATS: agar tripteína soya

Btox: beta toxina

C3b: componente C3b del complemento

C3i: componente C3 inactivado del complemento

C5a: fragmento proteico liberado a partir del clivaje del componente C5 del complemento

CDAP: 1-ciano-4-(dimetilamino)- piridinio

Clf: factor de agregación

CP(s): polisacárido(s) capsular(es)

CTS: caldo tripteína soya

DE: desviación estándar

D.O(s): densidad(es) óptica(s)

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP(s): desoxinucleótido(s) trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas

Fg: fibrinógeno

FITC: isotiocianato de fluoresceína

Fn: fibronectina

FnBP: proteína de unión a fibronectina

g: gramos

G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos

GR: glóbulos rojos

H₂O_d: agua destilada

H₂O_{mq}: agua desionizada mediante el sistema Milli- Q®

Hb: hemoglobina

Hp: haptoglobina

Ig: inmunoglobulina

IIM: inflamación intra mamaria

IL: interleuquina

IMF: intensidad media de fluorescencia

INF: interferón

IPTG: isopropil-β-d-tiogalactopiranosido

Isd: determinante de superficie

KDa: Kilo Dalton

l: litros

LB: linfocitos B

Lf: lactoferrina

LPS: lipopolisacáridos

LT: linfocitos T

LTA: ácidos lipoteichoicos

M: molar

LB: medio de cultivo Luria Bertani

mg: mili gramos

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

ml: mililitros

mM: milimolar

N: normal

NK: células asesinas naturales (*natural killer*)

nm: nanómetros

ON: toda la noche (*over night*)

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

pb: pares de bases

PBQ: *para*-benzoquinona

PBS: solución amortiguadora fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PM: peso molecular

PMN: neutrófilo polimorfonuclear

PTSAgs: del inglés Pyrogenic Toxin Superantigens

RCS: recuento de células somáticas

ROS: especies reactivas del oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

DE: desviación estándar

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

TA: ácidos teichoicos

TAE: solución tampón tris-acético-EDTA

TCR: receptor de células T

TH: respuesta inmune mediada por linfocitos T colaboradores

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF: factor de necrosis tumoral

Ufc: unidad formadora de colonias

UV: ultravioleta

V: volts

µg: microgramos

µl: microlitros

µM: micromolar

Resumen

La inflamación de las glándulas mamarias bovinas, enfermedad denominada mastitis bovina, causa las mayores pérdidas económicas, tanto al productor como a la industria láctea, siendo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) el principal agente etiológico de mastitis, tanto en Argentina, como en otros países de gran desarrollo lechero. Los principales programas de control de la enfermedad se basan en medidas de higiene y terapia antibiótica; sin embargo, las características de la patogénesis de *S. aureus* le confieren la habilidad de invadir tejidos y sobrevivir intracelularmente escapando a estas medidas de control tradicionales. De esta manera, la bacteria se mantiene protegida de la respuesta inmune del hospedador y de la acción de los antibióticos, favoreciendo el desarrollo de infecciones crónicas que resultan en daños permanentes en el tejido mamario. Esto, sumado a las crecientes evidencias acerca del impacto negativo que puede provocar el uso de antibióticos en animales para consumo sobre la salud pública, ha concentrado el interés de los investigadores en el desarrollo de vacunas como medidas de control alternativas. Desde hace décadas se viene trabajando en la búsqueda de una vacuna contra *S. aureus*, pero hasta el momento ninguna ha resultado efectiva en la prevención de nuevas infecciones bacterianas. Actualmente, tanto a los avances en el estudio de los mecanismos de virulencia de la bacteria, como de la defensa de la glándula mamaria, existe un consenso entre los investigadores en cuanto a las pautas a seguir para alcanzar una vacuna eficiente contra *S. aureus*. Para ser efectivas y seguras, las formulaciones desarrolladas deberían ser multicomponente, producidas mediante la tecnología del ADN recombinante y formuladas con un adyuvante de nueva generación, capaz de inducir una respuesta humoral y celular balanceadas, asegurando la producción de anticuerpos opsonicos y con rápido reclutamiento de neutrófilos.

El presente trabajo tuvo como objetivo general desarrollar un prototipo de vacuna multicomponente contra la mastitis bovina causada por *S. aureus*. La hipótesis de trabajo planteada es que, promoviendo una respuesta inmune contra diferentes antígenos bacterianos que intervienen en los estadios sucesivos de invasión y proliferación de *S. aureus*, se lograría inducir una respuesta inmunoprotectiva contra la bacteria. A partir de una búsqueda bibliográfica se identificaron los inmunógenos que produjeron los mejores resultados en modelos murinos y/o bovinos. Entre los candidatos encontrados, se seleccionaron las moléculas de adhesión ClfA y FnBPA de importancia en las etapas tempranas de la interacción parásito-hospedador, los polisacáridos capsulares CP5 y CP8 que facilitan la diseminación de la bacteria y la evasión del sistema inmune, la proteína IsdH involucrada en la supervivencia bacteriana y finalmente las exotoxinas Atox y Btox responsables de causar daños en el hospedador. El presente trabajo involucró la obtención de cada uno de los inmunógenos, la evaluación de la inmunogenicidad individual de cada componente en un modelo murino, y la formulación como vacuna multicomponente y prueba final en vaquillonas preñadas.

Los CP5 y CP8 se seleccionaron por su mayor prevalencia en la cuenca lechera Argentina. Estos se purificaron a partir de cepas productoras y se conjugaron a una proteína transportadora (la ASH) para conferirle propiedades inmunogénicas. En este trabajo se propuso y evaluó una técnica de conjugación que utiliza *p*-benzoquinona, la cual ha sido descrita como una metodología sencilla, reproducible, de alto rendimiento y económica, que para nuestro conocimiento, no ha sido aplicada previamente para la preparación de vacunas conjugadas. Se optimizó la conjugación de los CPs bacterianos a albúmina sérica humana (ASH) obteniéndose un alto rendimiento de productos conjugados (CP5-ASH_{PBQ}). El conjugado CP5-ASH_{PBQ}, formulado con el adyuvante AIF, fue evaluado en ratones luego de 4 dosis intraperitoneales de 7 µg de CP. La inmunización demostró ser eficiente en generar una respuesta T-dependiente, basada en altos títulos de anticuerpos IgG_{total}, y elevados niveles de IgG₁, IgG_{2a} e IgG₃. Además, los animales inoculados con el conjugado respondieron frente a un desafío con el CP5 nativo, realizado a los 3 meses post- inmunización, indicando que el CP5-ASH_{PBQ} es capaz de desarrollar memoria inmune contra el polisacárido. Los resultados indicaron que los CPs conjugados mediante la técnica de la PBQ, constituyen candidatos prometedores para la formulación de la vacuna multicomponente contra *S. aureus*.

Por otro lado, se obtuvieron las proteínas de interés mediante la tecnología del ADN recombinante. Se logró la producción exitosa de los inmunógenos rClfA, rFnBPA, rBtox y rIsdH; mientras que las distintas estrategias de clonado ensayadas para la obtención de Atox fallaron en conseguir la expresión adecuada de la toxina. Debido a esto, se decidió descartar la Atox de la formulación y continuar el trabajo con los otros componentes obtenidos. Dado que lograr una adecuada respuesta humoral con una baja dosis de los inmunógenos tiene importancia a la hora de combinar varias moléculas en una formulación multicomponente, los candidatos proteicos se ensayaron en dosis altas y bajas. Dicha evaluación se realizó en ratones utilizando AIF como adyuvante aplicando tres dosis intraperitoneales de 20 µg o 2 µg de cada proteína respectivamente. La dosis de 2 µg de proteína resultó igualmente eficiente que la dosis mayor para generar altos títulos de anticuerpos de IgG_{total}.

Todos los antígenos obtenidos se combinaron en dos inmunógenos multicomponentes, VacR1 (rClf, rFnBP y rBtox) y VacR258 (rClf, rFnBP, rBtox, rIsdH, CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}), empleando el adyuvante de nueva generación ISCOM-matrixTM. La inmunización de vaquillonas preñadas con dos dosis subcutáneas de las vacunas, generó importantes respuestas humorales tanto en sangre como en leche, dirigidas contra cada componente vacunal, asegurando la presencia de anticuerpos específicos durante el período de mayor susceptibilidad a adquirir infecciones por *S. aureus*. Además se detectaron altos niveles de IgG₂ sanguínea, descrita como subclase de importancia en la defensa contra las IIM por *S. aureus*. Los anticuerpos obtenidos demostraron ser funcionales, contribuyendo a reducir marcadamente la capacidad de la bacteria de invadir el tejido epitelial mamario, a neutralizarla actividad hemolítica de la Btox nativa y promoviendo la fagocitosis de la bacteria por PMN bovinos. En conclusión, VacR1 y VacR258 ofrecen un gran potencial para proteger contra las infecciones causadas por *S. aureus*,

por lo que constituyen candidatos prometedores a seguir evaluando como vacunas destinadas al control de la mastitis bovina causada por *S. aureus*.

Abstract

Bovine mammary glands inflammation, also referred to as bovine mastitis, causes major economic losses both to the producer and dairy industry. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is the main causative agent of mastitis in Argentina, as in other countries with large dairy development. The main control programs of mastitis are based on antibiotic therapy and hygiene, however, the features of *S. aureus* pathogenesis confer bacteria the ability to invade tissues and survive intracellularly escaping from this traditional control measures. In consequence, *S. aureus* remains protected from the host immune response and the action of antibiotics, favoring chronic infections development and resulting in permanent damage to the mammary epithelial tissue. Furthermore, growing evidences about the negative impact on public health of antibiotic use in food-producing animals, has focused researchers attention on the development of vaccines as alternative for mastitis control aimed to reduce the use of antimicrobials. For decades they have been working on finding a vaccine against *S. aureus*, but any of the approaches has been effective in preventing new bacterial infections. Based on both advances in the study of the bacteria virulence mechanisms and mammary gland immune defense, researchers have agreed on some guidelines to achieve an efficient vaccine against *S. aureus*: an efficient and safe vaccine against *S. aureus* should be a multicomponent formulation produced by recombinant DNA technology and formulated with a new generation adjuvant able to induce a balanced response with production of opsonic antibodies and rapid recruitment of neutrophils.

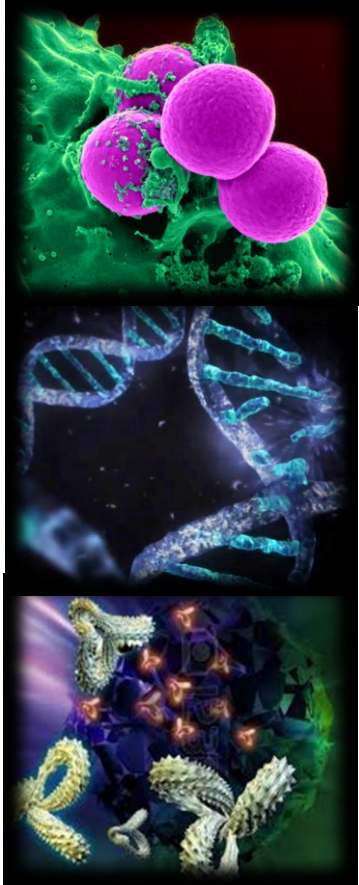
The aim of this work was to develop a multicomponent prototype vaccine against bovine mastitis caused by *S. aureus*. We hypothesized that promoting an immune response against different bacterial antigens involved in successive stages of invasion and proliferation of *S. aureus*, would achieve immune protection against bacteria. We identified from bibliography search the immunogens producing the best results in murine and /or cattle models. Among candidates found we chose ClfA and FnBPA which are important adhesion molecules in early stages of the parasite-host interaction, CP5 and CP8 capsular polysaccharides that facilitate the spread of bacteria and immune evasion, the IsdH protein involved in bacterial survival and exotoxins Btox and Atox responsible for causing damage to the host. This study included obtention of each one of the immunogens, evaluation of their individual immunogenicity in a mouse model, and their inclusion in a multicomponent vaccine formulation for the final test in heifers.

The CP5 and CP8 were selected for their higher prevalence in Argentina. These were purified from producer strains and conjugated to a carrier protein to impart immunogenic properties. We proposed and evaluated a conjugation technique employing p-benzoquinone, which has been described as an easy to achieve, reproducible, high yield and low cost methodology, but to our knowledge, it has never been applied for conjugate vaccine preparations. Conjugation of bacterial CPs to human serum albumin (HSA) was optimized with a high yield of conjugated products (CP5-HSA_{PBQ}). The CP5-HSA_{PBQ} conjugate obtained was evaluated in mice, formulated with the adjuvant IFA, administered in four intraperitoneal

doses of 7 µg of CP each. Immunization resulted efficient in generating a T-dependent response, based on high IgG_{total} titers and high levels of IgG₁, IgG_{2a} and IgG₃ subclasses. Moreover, animals inoculated with conjugate responded against a native CP5 challenge performed 3 months post immunization, indicating that the CP5-HSA_{PBQ} can develop immune memory against the polysaccharide. The results indicated that CPs conjugates prepared by PBQ technique are promising candidates for the development of multicomponent vaccine against *S. aureus*.

Furthermore, proteins of interest were obtained by recombinant DNA technology. The production of rClfA, rFnBPA, rBtox and rIsdH immunogens was achieved successfully; while different cloning strategies tested for Atox obtention failed to accomplish toxin expression. Because of this, it was decided to discard Atox from multicomponent formulation and continue working with the other components already obtained. Since achieve proper humoral response with a low dose of the immunogens is important when combining multiple molecules in a multicomponent formulation, the protein candidates were tested in high and low doses. This evaluation was conducted in mice using IFA as adjuvant and applying three intraperitoneal doses of 20µg or 2µg of each protein. The 2 µg doses were as efficient as the major ones to induced IgG_{total} antibodies titers.

Molecules obtained were combined into two multicomponent immunogens, VacR1 (rClf, rFnBP and rBtox) and VacR258 (rClf, rFnBP, rBtox, rIsdH, CP5-HSA_{PBQ} and CP8-HSA_{PBQ}), employing the new generation adjuvant ISCOM Matrix™. Subcutaneous immunization of pregnant heifers with two doses of vaccines, generated good humoral responses both in blood and milk, specifically directed against each vaccine component, ensuring specific antibodies presence during the period of high susceptibility to acquire *S. aureus* infections. Also high IgG₂ levels were detected in serum, which has been described as an important subclass in *S. aureus* IIM defense. More importantly, antibodies obtained demonstrated to be functional, contributing to significantly reduce bacteria capability to invade mammary epithelial tissue, to neutralize hemolytic activity of the native Btox and promoting *S. aureus* phagocytosis by bovine PMN. In conclusion, VacR1 y VacR258 yield great potential for protecting against bacteria infections, therefore they constitute promising candidates for further evaluation as vaccines intended to control *S. aureus* bovine mastitis.



Capítulo I

Introducción a la mastitis bovina causada por *S. aureus*.

I-1. MASTITIS BOVINA

La mastitis bovina es una inflamación de la glándula mamaria en respuesta a una agresión local al tejido mamario que puede ser de origen infeccioso, mecánico o tóxico. Sin embargo, la gran mayoría de los casos de mastitis son debidos a infecciones intra-mamarias (IIM) causadas por microorganismos, principalmente bacterias, que invaden la ubre, se desarrollan y generan productos tóxicos perjudiciales para el tejido mamario [Shalm y col., 1971]. La mastitis es, una de las enfermedades más prevalentes y perjudiciales del ganado bovino lechero [Hillerton y Berry, 2005]. Mundialmente, las pérdidas anuales causadas por esta enfermedad son de aproximadamente 35 mil millones de pesos anuales y representa aproximadamente el 26% del costo total de las enfermedades [Philpot y Nickerson, 1992]. La IIM altera la composición de la leche, ya que reduce las cantidades de fósforo, calcio, proteínas (caseína), azúcares (lactosa), grasa láctea, e incrementa las cantidades de inmunoglobulinas, cloruro de sodio, carbonato de sodio y enzimas en la leche. Por lo tanto, la enfermedad no sólo afecta la economía de los productores sino también la imagen del sector lechero.

Las IIM son consideradas una enfermedad compleja, producto de la interacción de varios factores de riesgo:

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

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

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

I-1-1. Formas de mastitis

La enfermedad puede presentarse, según el grado de daño al tejido mamario, como **mastitis subclínica**, **mastitis clínica** ó **mastitis crónica**. La incidencia de la enfermedad varía con la edad del animal y el estadio de lactancia; la mayoría de los casos ocurren en vaquillonas en edad reproductiva o preñadas, siendo menos probable en animales jóvenes [Oliver y col., 1999]. En los casos de mastitis clínica los síntomas de la enfermedad son evidentes y la severidad varía mucho con el transcurso de la infección. El cuarto infectado presenta inflamación, se producen secreciones anormales de leche, con presencia de coágulos, descamaciones, suero descolorido y algunas veces sangre [Wattiaux, 2001]. La mastitis clínica puede adquirir un estadio agudo, en el que los signos son una ubre enrojecida y endurecida debido a la

marcada inflamación, fibrosis y reacciones sistémicas como fiebre, pulso acelerado, anorexia, deshidratación, desgano, debilidad, reducción de la producción de leche, hasta puede ocasionar la muerte del animal [Hillerton y Berry, 2005]. En la figura 1 puede observarse, a modo de ejemplo, una imagen de un caso clínico de mastitis bovina.

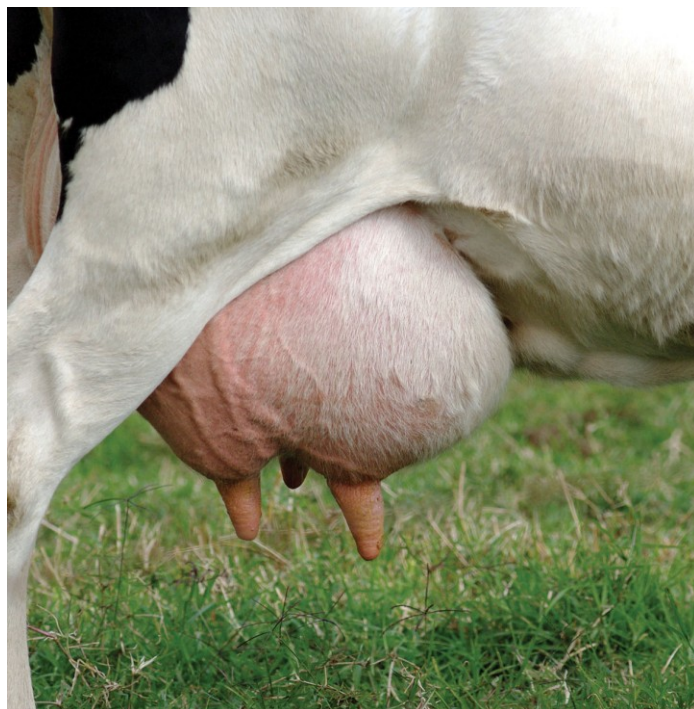


Figura 1. Vaca Holstein con diagnóstico de mastitis clínica. Se visualiza la inflamación y enrojecimiento de las glándulas mamarias. [Fuente: <http://www.motivar.com.ar/2013/04/mas-videos-on-line-del-inta-lechero/>].

La mastitis subclínica se trata de una infección de larga duración pero leve, sin síntomas visibles. El animal parece saludable, la ubre no muestra signos de inflamación y la leche posee aspecto normal. Sin embargo, los microorganismos están presentes en la glándula y las células somáticas de la leche que combaten las infecciones muestran elevados recuentos. La mayoría de los casos de mastitis son subclínicos [Wattiaux, 2001]. Diferentes causas hacen que el control de este tipo de mastitis resulte de mayor importancia que el tratamiento de los casos clínicos. Por un lado, la mastitis subclínica puede prolongarse por largos períodos, volviéndose casos de mastitis crónicas, con reducción en la producción de leche, lo cual ocasiona mayores pérdidas económicas [Wattiaux, 2001]. Por otro lado, los animales con mastitis subclínica son reservorios de los organismos y pueden contagiar a otras vacas sanas. Incluso, algunos casos pueden volverse clínicos durante algún estadio de lactación posterior a la infección [Wattiaux, 2001; Hillerton y Berry, 2005].

I-1-2. Susceptibilidad a la mastitis bovina

Las vacas lecheras están expuestas a numerosos factores genéticos, fisiológicos y medioambientales que comprometen la inmunidad del hospedador y aumentan la incidencia de mastitis. Las IIM pueden afectar a las hembras bovinas tanto desde antes del comienzo de su vida reproductiva como durante la primera gestación.

Durante la preñez, el estrés fisiológico asociado a la rápida diferenciación del parénquima secretor, el crecimiento intenso de la glándula mamaria y el comienzo de la síntesis de leche y otras secreciones, están acompañados por una alta demanda de energía que incrementa los requerimientos de oxígeno [Sordillo, 2005]. Esto lleva a una sobre-producción de reactivos derivados del oxígeno (ROS, del inglés “Reactive oxygen species”) que median daños tisulares y producen estrés oxidativo. Si bien el hospedador produce enzimas antioxidantes para proteger del efecto dañino de los ROS, durante el parto hay un desbalance, que resulta en un incremento del estrés oxidativo [Sordillo, 2005]. Además, durante la preñez y el parto se estimula la producción de una variedad de hormonas que tienen efectos importantes sobre las respuestas inmunes, que aumentan la susceptibilidad a las IIM [Sordillo, 2005]. Los glucocorticoides producen una disminución en el número total, distribución y función de leucocitos en sangre bovina, menores niveles de IgM en secreciones mamarias, reducción en la expresión de los MHC sobre las células mononucleares e inhibición de la producción de citoquinas [Burton y Erskine, 2003].

Los distintos estadios del ciclo de lactancia, también afectan las defensas de la glándula mamaria bovina. Principalmente durante las dos semanas antes del parto y hasta las tres primeras semanas de lactancia, se producen alteraciones dramáticas en los mecanismos de defensa del hospedador. En consecuencia, el período del parto constituye un período de gran susceptibilidad [Sordillo y Streicher, 2002].

Como se mencionó anteriormente, la presencia de IIM en el parto está también altamente asociada a factores ambientales. Las máquinas de ordeño pueden causar traumas en los pezones, facilitando la colonización por patógenos causantes de mastitis [Sordillo, 2005]. Por lo tanto, estas prácticas son determinantes de la aparición de IIM subclínicas y clínicas al parto. Además, el confinamiento de altas densidades de vacas por unidad de área, sumado a que las camas de los animales constituyen un soporte para el crecimiento bacteriano, también contribuyen a una mayor susceptibilidad a IIM [Hogan y Larry Smith, 2003]. Por otro lado, la selección genética para maximizar la capacidad de producción de leche produce estrés metabólico, que aumenta la susceptibilidad de los animales a adquirir mastitis [Heringstad y col., 2003].

Los programas de control de mastitis, deben incluir medidas de manejo que eviten las potenciales fuentes de contagio y controlen los factores de riesgo. De esta forma, al minimizar la aparición de IIM en

estas etapas tempranas, las vaquillonas estarán en condiciones de desarrollar todo su potencial productivo durante su primera lactancia.

I-1-3. Mastitis bovina causada por *S. aureus*

La mastitis puede ser causada por distintos agentes etiológicos, como bacterias, hongos, algas y virus, pero las bacterias constituyen el grupo de mayor importancia. Más del 95% de los cuadros de mastitis clínica y subclínica son causados por un pequeño grupo de bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* y bacilos gran-negativos. Estos patógenos, reconocidos como los mayores o principales causantes de mastitis, se categorizan en contagiosos y ambientales [Yancey, 1999]. Entre los contagiosos más prevalentes se destacan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* [Calvinho y Tirante, 2005]. *Streptococcus uberis* y las bacterias coliformes corresponden a los principales patógenos ambientales de mastitis [Yancey, 1999].

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es el principal causante de mastitis en vacas y otros rumiantes, tanto en Argentina como en la mayoría de los países de gran desarrollo lechero [Sordelli y col., 2000; Tollersrud y col., 2000; Calvinho y Tirante, 2005; Castro y col., 2006]. Sin embargo, los porcentajes de prevalencia de los patógenos varían entre los distintos países e incluso entre las provincias/estados ó regiones de un mismo país. En Argentina, *S. aureus* fue identificado en el 13,9 - 54% de los aislamientos provenientes de vacas con mastitis, resultando el microorganismo predominante, tanto en casos subclínicos como clínicos, en todas las cuencas analizadas [Revelli y Rodríguez, 2001; Calvinho y Tirante, 2005; Dieser y col., 2013].

S. aureus es un coco Gram positivo, y su hábitat natural es la piel y las mucosas de los mamíferos [Sutra y Poutrel, 1994]. En el caso de los bovinos, puede colonizar la piel de la ubre y el canal del pezón, pudiendo entonces ser transmitido fácilmente entre animales durante el ordeño, desde una vaca infectada a otra sana [Roberson, 1999]. Si bien su diseminación es lenta, el problema radica en su capacidad de sobrevivir largo tiempo fuera de la ubre y multiplicarse en heridas abiertas y pliegues de la piel. Cuando *S. aureus* infecta la glándula mamaria, lo hace causando generalmente mastitis subclínicas de larga data, con episodios recurrentes de síntomas clínicos moderados, marcado incremento de RCS y eliminación cíclica del agente a través de la leche. Los casos clínicos severos de IIM por *S. aureus* producen más daño al tejido mamario que las causadas por los otros microorganismos contagiosos, pudiendo perjudicar el desarrollo mamario, afectando la producción de leche luego del parto y acortando la vida útil del animal en el rodeo [Myllys y Rautala, 1995; Roberson, 1999]. La mastitis puede ocasionar disminuciones en la producción láctea de hasta un 45% por cuarto infectado y un 15% por animal [Roberson, 1999].

I-2. INMUNIDAD DE LA GLÁNDULA MAMARIA BOVINA

I-2-1. Anatomía de la glándula mamaria bovina

Para comprender la interacción entre las bacterias patógenas y la glándula mamaria, y cómo se desarrolla la IIM, es necesario conocer los aspectos básicos de la anatomía de las ubres [Figura 2].

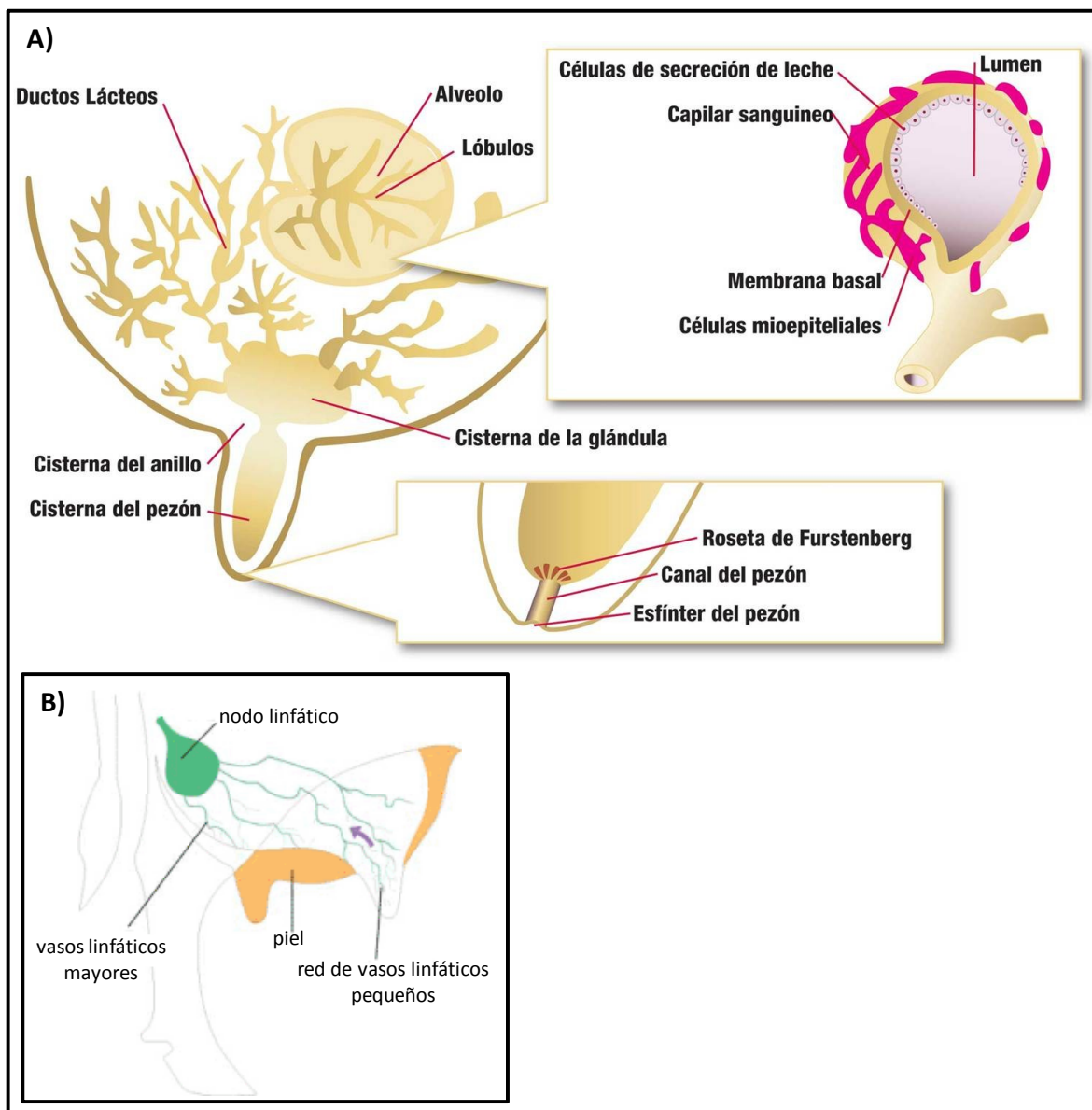


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria bovina. A) Estructura de la glándula mamaria bovina. Imagen extraída de http://www.delaval.com/Dairy_Knowledge/EfficientMilking/The_Mammary_Gland.htm. B) Esquema del sistema linfático de la ubre. [Esquema adaptado de http://www.delaval.com/Dairy_Knowledge/EfficientMilking/The_Mammary_Gland.htm].

La glándula mamaria bovina consiste en cuatro glándulas separadas (cuatro cuartos de ubre), cada una con un pezón. Cada cuarto representa una unidad, motivo por el cual la leche sintetizada en uno de los cuartos no puede fluir hacia los otros tres, además esto hace que la mastitis pueda estar confinada a un solo cuarto de ubre [Wolter y col., 2002]. La ubre está formada por un sistema de conductos, compuestos por la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, los ductos lácteos y los alvéolos [Wolter y col., 2002]. Los alvéolos constituyen en conjunto un lóbulos y consisten en una estructura esférica cuyas paredes están revestidas de membrana basal, y sobre ésta última se organiza una capa de células secretoras en las que se sintetiza la leche [Wolter y col., 2002]. La leche es continuamente sintetizada en el área alveolar y, entre los ordeños, se almacena en los alvéolos, conductos lácteos, ubres y cisterna del pezón [Wolter y col., 2002].

El pezón, que ayuda en la eyección de la leche, está compuesto por la cisterna del pezón y el canal del pezón que se unen en una zona llamada Roseta de Fürstenberg, la cual participa en la defensa local contra la mastitis [Wolter y col., 2002]. En la punta del pezón, las fibras musculares se ordenan en forma circular para formar un músculo obturador llamado esfínter [Wolter y col., 2002]. Además, en el canal del pezón, hay queratina y otras sustancias similares que actúan como barrera protectora al ingreso de las bacterias.

La glándula mamaria está irrigada por vasos sanguíneos, arterias y venas que le proveen continuamente de nutrientes necesarios para la síntesis de la leche. Las ubres también poseen nodos linfáticos, fuente de linfocitos que destruyen agentes extraños, y una red de vasos linfáticos que conducen los productos indeseables fuera de la ubre [Figura 2.B] [Wolter y col., 2002].

I-2-2. Mecanismos de defensa de la glándula

La infección de la glándula mamaria ocurre generalmente por vía ascendente dado que los organismos pasan a través del conducto del pezón hacia la cisterna del mismo y pueden subsecuentemente establecerse en un área de tejido secretorio [Anderson, 1983]. El desarrollo de la IIM, así como la severidad de la enfermedad, dependen tanto de la efectividad de los mecanismos de defensa del hospedador como de la velocidad de multiplicación del microorganismo y del tipo y expresión de factores de virulencia [Shalm y col., 1971]. De hecho, estudios recientes de epidemiología molecular han demostrado una asociación entre la presencia de determinados factores de virulencia del microorganismo y la severidad de la mastitis [Fournier y col., 2008]. De esta forma, tanto los factores que hacen a los mecanismos de defensa del hospedador como los relacionados con el ataque del patógeno invasor son altamente significativos para determinar el resultado de la infección.

La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que pueden dividirse, al igual que la inmunidad sistémica, en dos categorías: Inmunidad innata e inmunidad adaptativa

[Rainard y Riollet, 2006]. La inmunidad innata mamaria es rápidamente activada por numerosos estímulos en el sitio de la infección y constituye una defensa clave durante las etapas tempranas de la infección [Sordillo, 2005]. Está mediada por barreras físicas del pezón, macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) y algunos factores solubles [Sordillo, 2005]. La inmunidad adaptativa, es activada por determinadas moléculas del patógeno, las que son reconocidas por anticuerpos, macrófagos y algunas poblaciones linfoides [Sordillo, 2005]. La protección óptima de la glándula mamaria requiere que los factores de la inmunidad innata y adaptativa interaccionen de manera coordinada. Sin embargo, muchos factores de la inmunidad de la glándula mamaria son subóptimos durante distintos períodos del ciclo de lactancia [Sordillo y Streicher, 2002]. Como se mencionó anteriormente, desde las dos semanas previas al parto hasta las primeras tres semanas de lactancia los mecanismos de defensa del hospedador son alterados de manera drástica [Sordillo y Streicher, 2002].

I-2-2-1. Defensas anatómicas

La mastitis ocurre cuando las bacterias son capaces de entrar a la glándula mamaria por el canal del pezón, por lo cual éste es considerado la primera línea de defensa contra patógenos invasores. El pezón contiene un esfínter muscular que lo mantiene cerrado entre ordeñes y evita la penetración de bacterias [Zecconi y col., 2000]. El canal del pezón está recubierto por queratina, un material laxo derivado del epitelio escamoso estratificado, que posee propiedades antimicrobianas y obstruye la migración de las bacterias hacia la cisterna de la glándula. La queratina puede unir e inmovilizar la mayoría de las bacterias no encapsuladas causantes de mastitis [Rainard y Riollet, 2006]. El extremo del pezón posee un esfínter de músculo liso, que lo mantiene estrechamente cerrado entre los ordeñes [Rainard y Riollet, 2006].

Como resultado de la eficiencia de las barreras del pezón, el lumen intramamario es aséptico [Rainard y Riollet, 2006]. Por lo tanto, no se encuentra estimulado por componentes bacterianos como otros epitelios, tales como el intestino, epitelio bucal ó respiratorio, de manera que cualquier bacteria es detectada como un agente extraño.

I-2-2-2. Defensas celulares

Otra peculiaridad de la inmunidad de la glándula mamaria, es la presencia de un gran número de leucocitos epiteliales y un repertorio de receptores sobre las células del epitelio mamario [Rainard y Riollet, 2006]. Esto sugiere un rol fundamental del conducto del pezón en las defensas de la glándula mamaria, principalmente relacionado a sensar y proteger contra las bacterias invasoras.

Los patógenos que logran vencer aquellas barreras anatómicas e ingresar en el canal del pezón, deben escapar de estas defensas celulares y solubles de la glándula mamaria para poder desencadenar la enfermedad. Se han encontrado diferentes tipos celulares en la leche bovina, los cuales incluyen PMN,

linfocitos, eosinófilos, macrófagos y células epiteliales [Paape y col., 2002]. Dada la presencia de éstas últimas, se llamó células somáticas al conjunto de células de la leche [Paape y col., 2002]. Los recuentos de células somáticas (RCS) en leche proveniente de cuartos sanos es generalmente de $< 10^5$ células/ml [Sutra y Poutrel, 1994]. La infección de la glándula mamaria implica un flujo de leucocitos, mayoritariamente PMN, desde la sangre hacia la leche y que aumenta al menos un orden del RCS. Luego de una inoculación intramamaria experimental con *S. aureus*, los RCS en leche comenzaron a elevarse entre 1-3 h luego del desafío y pueden alcanzar varios millones de células/ml en 24-48 h [Sutra y Poutrel, 1994]. La cantidad total de la población de leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) en la glándula, así como su actividad, juegan un rol primordial en la determinación de la severidad y duración de las infecciones [Sordillo, 2005].

Células endoteliales mamarias (MEC)

Las células epiteliales mamarias (MEC), junto a los macrófagos, son los dos primeros tipos celulares a los cuales se enfrentan los patógenos al ingresar a la glándula mamaria. Las MEC son capaces de sintetizar y secretar quemoquinas que modulan los componentes inmunes de manera autócrina y parácrina [Rainard y Riollet, 2006]. Las funciones principales se asocian al reclutamiento de neutrófilos y linfocitos hacia la leche. Estudios *in vitro* han demostrado que las MEC son capaces de secretar IL-8, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α [Rainard y Riollet, 2006].

Macrófagos

Los macrófagos representan el tipo celular predominante en leche y tejido de glándulas mamarias sanas [Rainard y Riollet, 2006]. Los macrófagos mamarios, no poseen receptores Fc para anticuerpos opsonofagocíticos [Nordhaug y col., 1994a] y el número disminuye durante las IIM. Se cree que las funciones de los macrófagos mamarios consisten en actuar como células APC, secretar sustancias que faciliten el reclutamiento de neutrófilos fagocíticos, y moléculas pro-inflamatorias (leucotrienos, prostaglandinas y citoquinas) [Sutra y Poutrel, 1994; Sordillo, 2005]. En el periparto las habilidades funcionales de los macrófagos se ven alteradas, teniendo consecuencias directas sobre la incidencia de la enfermedad. La capacidad de fagocitosis y presentación del antígeno mediadas por los macrófagos se ve disminuída, lo que podría ser la causa de las respuestas inmunes débiles mediadas por linfocitos [Sordillo y Streicher, 2002]. En el período de periparto, se ha evidenciado la presencia de bajos niveles de IgM, la cual opsoniza al patógeno favoreciendo la fagocitosis tanto por macrófagos como neutrófilos [Detilleux y col., 1995]. La cantidad insuficiente de opsonina podría asociarse a la menor capacidad fagocítica de los macrófagos. Por otro lado, la expresión de MHC II disminuye en dicho período, lo cual explicaría la reducción de la presentación del antígeno de las células [Fitzpatrick y col., 1992].

Neutrófilos

Los neutrófilos son uno de los principales efectores de la defensa contra patógenos mamarios. Las vacas que evidencian cura espontánea de IIM, tienen una respuesta de neutrófilos rápida y masiva, mientras que los animales con un reclutamiento tardío de neutrófilos sucumben en formas de mastitis agudas y más severas [Burton y Erskine, 2003].

Los neutrófilos se encuentran circulando en la sangre y en constante contacto con el endotelio de los vasos sanguíneos para sensor señales de tejido infectado o dañado. En presencia de daño, el endotelio y los neutrófilos se activan expresando moléculas de adhesión en la superficie que interaccionan fuertemente entre sí (hiperadherencia) [Burton y Erskine, 2003]. Esta unión permite que los neutrófilos comiencen a atravesar las células endoteliales y la pared de los vasos sanguíneos (diapédesis) para migrar por la matriz extravascular hasta alcanzar el sitio de infección guiados por las citoquinas pro-inflamatorias (quimiotaxis) [Burton y Erskine, 2003]. Los principales quimioattractantes son la IL-8, secretada por las células endoteliales activadas y macrófagos mamarios; las IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e INF- γ , producidas por macrófagos mamarios, LT y neutrófilos; los componentes del complemento C5a y C3a; prostaglandinas y componentes bacterianos como el LPS de las bacterias Gram negativas [Paape y col., 2002; Sordillo, 2005]. Las señales pro-inflamatorias, además, regulan la expresión de numerosos receptores en la superficie del neutrófilo que promueven el reconocimiento y contacto con el patógeno. Este contacto es de gran importancia en la glándula mamaria donde la los volúmenes de leche diluyen significativamente la concentración de neutrófilos reclutados [Burton y Erskine, 2003].

Una vez en el foco de infección, los neutrófilos actúan fagocitando y destruyendo a las bacterias dentro de los fagosomas, por estallido respiratorio, y secretando pequeños péptidos antimicrobianos (defensinas) capaces de matar a una variedad de patógenos de mastitis [Sordillo, 2005]. Durante el estadio temprano de no-lactancia, las secreciones mamarias presentan RCS y concentraciones de inmunoglobulinas normales, pero los neutrófilos son disfuncionales [Burton y Erskine, 2003]. Esto se debe a que los neutrófilos fagocitan indiscriminadamente restos celulares, micelas de caseína, glóbulos de grasa, disminuyendo drásticamente la capacidad de reconocimiento y la fagocitosis del patógeno intramamario [Burton y Erskine, 2003]. Además, se produce un incremento de la transferencia de IgG₁, ya que las glándulas mamarias se preparan para la cría, y se evidencia una regulación negativa de los receptores Fc de los neutrófilos, resultando en una reducción significativa de la capacidad opsonofagocítica de los neutrófilos de la leche [Targowski y Niemialtowski, 1986]. Durante el período de parto, a pesar de los altos RCS en la glándula, algunas funciones de los neutrófilos como capacidad de fagocitosis, de causar estallido respiratorio, la quimiotaxis y la capacidad de migración hacia el sitio de infección debido a deficiencias en las moléculas de adhesión, también están alteradas ó dañadas [Paape y col., 2002; Burton y Erskine, 2003]. Además, 2 semanas antes del parto, los neutrófilos se

diluyen en las secreciones mamarias debido a la formación del calostro rico en grasa, caseína e IgG₁, fenómenos que podrían contribuir a la susceptibilidad a la mastitis.

De los antecedentes mencionados, se destaca que un gran número de neutrófilos circulantes sería beneficioso en la defensa contra las IIM, ya que son células rápidamente disponibles para responder al reclutamiento al momento de una infección. Sin embargo, para ser efectivas estas células deben ser capaces de trasvasar el endotelio y migrar dentro de la ubre hacia el sitio de infección. A su vez, el mejor desempeño de los neutrófilos bovinos se logra cuando el patógeno es previamente pre-opsonizado por anticuerpos, especialmente la IgG₂, como se describe más adelante.

Células asesinas naturales (NK)

Las células NK son linfocitos grandes y granulares que tienen actividades citotóxicas independientes del MHC, por lo que pertenecen al sistema inmune innato [Sordillo, 2005]. Emplean sus receptores Fc para ejercer su acción citotóxica dependiente de anticuerpos, durante la cual liberan sus gránulos conteniendo perforinas y granzimas, que destruyen la célula diana por desorganización de la membrana celular [Sordillo, 2005]. Las NK son capaces de matar bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, lo cual les confiere importancia en la prevención de infecciones mamarias [Shafer-Weaver y Sordillo, 1996]. Se ha evidenciado que la IL-2 en la glándula mamaria bovina, incrementa la actividad bactericida de las NK, frente a varios agentes causantes de mastitis, entre ellos *S. aureus* [Sordillo y col., 1991; Shafer-Weaver y Sordillo, 1996]. Sin embargo, no se han estudiados los posibles cambios que sufren estas células en el período de periparto, por lo cual se desconoce su verdadero rol durante las IIM.

Linfocitos T y B

Además de las células anteriores, presentes en las secreciones de la ubre, son importantes las células que se encuentran infiltrando en el tejido mamario. En las glándulas mamarias, predominan los linfocitos T CD8+ (LT, CD8+), a diferencia de la sangre periférica donde prevalecen los linfocitos CD4+ (LT, CD4+) [Shafer-Weaver y Sordillo, 1996]. Durante la mastitis bovina, la proporción celular cambia y aumenta la población CD4+. Según el entorno de citoquinas generado durante la presentación del antígeno a las CD4+, mediada por los LB y macrófagos, se desarrollará una respuesta inmune del tipo TH₁ o TH₂ [Brown y col., 1998]. Las respuestas inmunes tipo TH₁ se caracterizan por la expresión de IL2 e IFN- γ , y la presencia de IgG₂ como inmunoglobulina predominante. La secreción de IL-4, IL-5 e IL-10, y la presencia de anticuerpos del tipo IgG₁ e IgM, se asocian a respuestas TH₂ [Estes, 1996; Brown y col., 1998]. Durante el período del periparto, en respuesta al estrés, se secretan grandes cantidades de cortisol y hormonas esteroideas a la sangre, que inducen la polarización de la respuesta a TH₂, asociada a una mayor susceptibilidad a adquirir mastitis [Shafer-Weaver y col., 1999].

Las células CD8⁺ tienen funciones citotóxicas ó supresoras que, respectivamente contribuyen a la eliminación de las células del hospedador que expresan antígenos extraños en el contexto del MHC I, ó a la modulación del sistema inmune durante la infección bacteriana [Sordillo, 2005]. Los estudios en los que se han evaluado las secreciones lácteas de glándulas mamarias de vacas lecheras infectadas con *S. aureus*, han demostrado que los CD8⁺ activados son capaces de alterar y/ó suprimir las respuestas proliferativas de los CD4⁺ [Park y col., 1993]. El rol inmunomodulador de los LT CD8⁺ depende del estadio de lactancia. En la mitad de la lactancia las células bovinas exhiben actividad citotóxica y expresan principalmente INF- γ , mientras que durante el período post-parto, no se evidencia citotoxicidad y predomina la IL-4 [Sordillo y col., 1997; Shafer-Weaver y col., 1999]. Esto sugiere que durante el periparto, hay un tráfico preferencial de CD8⁺ supresores hacia la glándula mamaria y secreciones, que podría ser responsable de la baja respuesta de la población local de linfocitos, comparada con la de aquellas células de los estadios tardío de la lactancia [Sordillo, 2005]. También se ha sugerido que los CD8⁺ podrían actuar removiendo células muertas ó dañadas, cuya presencia incrementaría la susceptibilidad a infecciones en la glándula mamaria [Taylor y col., 1994].

Si bien la población de linfocitos es principalmente de LT, hay algunos LB en la glándula mamaria, cuyo rol es producir anticuerpos contra los patógenos invasores [Sordillo, 2005] y actuar, junto a los macrófagos y células dendríticas, como células presentadoras a los LT. A diferencia de los LT, la población de LB se mantiene relativamente constante durante las distintas etapas de la lactancia [Shafer-Weaver y col., 1996].

I-2-2-3. Defensas solubles

La habilidad de los macrófagos y neutrófilos para fagocitar las bacterias invasoras es clave en la inmunidad innata [Paape y col., 2002]. Una fagocitosis óptima requiere de la presencia de los componentes del complemento y anticuerpos específicos. La unión del complemento y las inmunoglobulinas a los receptores de la superficie de los PMN produce la activación de dichas células, con la consecuente generación de ROS (aniones superóxido y peróxido de hidrógeno) [Paape y col., 2002]. Estos mecanismos en conjunto, resultan en una más rápida ingestión del patógeno, y su eliminación por el fenómeno denominado estallido respiratorio.

Inmunoglobulinas

En bovinos, los principales isotipos de anticuerpos son la IgA, IgM, IgG₁ e IgG₂ [Barrio y col., 2003]. Guidry y col., demostraron que la IgG₂ y la IgM son importantes para incrementar la fagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos sanguíneos [Guidry y col., 1993]. Sin embargo, la IgM requiere de la fijación del complemento para lograr la fagocitosis efectiva por los PMN [Burton y Erskine, 2003]. Además, tanto la IgM como el complemento, se encuentran en bajas concentraciones en leche incluso durante las IIM,

por lo cual se cree que en la glándula mamaria esta inmunoglobulina tiene una función de neutralización de las toxinas bacterianas más que de contribución a la fagocitosis [Burton y Erskine, 2003].

La IgG₁ es el isotipo mayoritario en las secreciones de glándulas mamarias sanas, particularmente en calostro, dada su transferencia desde la sangre por transporte selectivo [Nordhaug y col., 1994a]. La concentración es entre 10-20 veces mayor a la de IgG₂ [Barrio y col., 2003]. De la misma manera que con las células del sistema inmune, los niveles y las funciones de las inmunoglobulinas se modifican durante el parto, tendiendo a funciones inmunosupresoras que favorecen la incidencia de la enfermedad [Sordillo, 2005]. IgG₁ es opsonica para los macrófagos residentes, pero no para los neutrófilos bovinos, por lo cual tendría un rol más importante durante el comienzo de una infección, cuando el patógeno invade la glándula [Nordhaug y col., 1994a; Barrio y col., 2003]. La IgG₁, contribuiría a neutralizar toxinas bacterianas, bloquear la colonización bacteriana y promover la fagocitosis por neutrófilos a través de la fijación de complemento [Burton y Erskine, 2003].

La IgG₂ tiene una potente actividad opsonica para los neutrófilos bovinos, independientemente de la fijación del complemento [Nordhaug y col., 1994b; Burton y Erskine, 2003; Sordillo, 2005]. Además, de la misma manera que la IgG₁, IgG₂ contribuye a la neutralización de las toxinas bacterianas [Tollersrud y col., 2000]. Los neutrófilos bovinos, durante la migración hacia el tejido infectado, sufren una regulación positiva de la expresión de los receptores Fc de alta afinidad para la IgG₂ unida a la superficie del patógeno. En contraste, estas células no expresan receptores para IgG₁ e IgA; y parecen desprender los receptores para IgM durante la migración, para luego re-sintetizarlos una vez en la leche [Burton y Erskine, 2003]. Un trabajo realizado con vacas Rojas Danesas, las cuales presentan deficiencias genéticas en la producción de IgG₂, mostraron una alta frecuencia de mastitis comparado con animales normales [Nansen, 1972]. De la misma manera, varios estudios han demostrado que la falta del isotipo IgG₂ se correlaciona con una incidencia incrementada de mastitis, lo cual sugiere que la IgG₂ tiene un rol importante en la fagocitosis de las bacterias en la glándula mamaria [Mallard y col., 1998; Paape y col., 2002]. También se han reportado ensayos realizados con vacas Holstein, en los que existe una correlación significativa entre las concentraciones de IgG₂ en suero y los casos mastitis clínica; mientras que no se encuentra dicha relación respecto de IgG₁, IgM ó IgA [Mallard y col., 1983; Mallard y col., 1998].

Una vez que la infección comenzó, hay reclutamiento de grandes cantidades de neutrófilos e IgG₂ hacia la glándula mamaria, y luego de 4-12 h esta subclase se vuelve dominante [Nordhaug y col., 1994a]. Incluso, el transporte selectivo de IgG₁ disminuye y a las 24 h de la infección se produce la reversión de la relación IgG₁/IgG₂, respecto de la normal y adquiere importancia la IgG₂ en la defensa de la glándula mamaria [Nordhaug y col., 1994a; Burton y Erskine, 2003]. Luego de una fase de inflamación aguda, se restaura el transporte selectivo de IgG₁, lo cual está acompañado de la formación de inmunocomplejos

que bloquean los receptores Fc (para IgG₂) en los neutrófilos favoreciendo la unión de IgG₁ al antígeno [Targowski y Klucinski, 1985; Targowski y Niemialtowski, 1986]. A su vez, luego del primer día de infección, los neutrófilos comienzan a fagocitar glóbulos de grasa, así como también las proteínas de la leche se pegan a su superficie, volviéndolos incapaces de fagocitar efectivamente al patógeno [Burton y Erskine, 2003]. Se ha observado que los animales que eliminan al patógeno intramamario durante las fases tempranas de la inflamación, dan un pico de IgG₂ en leche más rápidamente que el pico de SCC (entre los que se incluyen los neutrófilos). Esta cinética sería crucial ya que favorece el reconocimiento del patógeno por la IgG₂ y contribuye a la rápida fagocitosis apenas los neutrófilos ingresan en la glándula (y antes de la pérdida de la capacidad opsonica de la leche). Por lo tanto, la IgG₂ tiene un rol crucial en la eliminación temprana y exitosa del patógeno intramamario [Colditz y Watson, 1985].

Como se mencionó previamente, la IgG₂ no está presente en la glándula mamaria, sino que la mayoría de la IgG₂ presente en la leche infectada, proviene de la sangre donde es secretada por los LB del sistema inmune periférico. Cuando un patógeno ingresa al organismo, es reconocido por las células presentadoras de antígeno (APC) y presentado al sistema inmune adaptativo en los linfonodos. Cuando dicha presentación conduce a la diferenciación de las células T (TH₀) a TH₁, la presencia de IL-2 en el entorno induce a las TH₁ a que secretan INF- γ y otras citoquinas [Estes, 1996]. Por otro lado, los LB circulantes al llegar a un linfonodo, se encuentran y reconocen al antígeno a través de las IgM de membrana, lo cual los activa e induce la secreción de anticuerpos IgM contra el patógeno. Mediante la cooperación de las células TH₁ y el entorno de INF- γ , los LB sufren el cambio de isotipo y secretan grandes cantidades de IgG₂ a la sangre [Estes, 1996; Brown y col., 1998], las cuales circularán hacia la glándula mamaria inflamada para ejercer su acción en defensa contra el patógeno. A su vez, INF- γ es crítico para la activación de neutrófilos y su reclutamiento hacia el sitio de infección.

Para que haya activación de los TH₁ en los nodos linfoides, el antígeno debe ser expuesto en alta densidad sobre las MHC II de las APC. Esto ocurre frente a una infección severa y prolongada ó tras la inmunización de los animales contra el patógeno en cuestión [Burton y Erskine, 2003]. En las vacas lecheras, el sistema inmune periférico no es normalmente expuesto a los patógenos causantes de mastitis [Burton y Erskine, 2003]. Esto demuestra la necesidad de inmunizar animales para lograr protección efectiva contra las IIM; la inmunización debe estimular una fuerte respuesta TH₁, con secreción de INF- γ , para favorecer la producción de anticuerpos IgG₂ y el reclutamiento de neutrófilos a la glándula mamaria.

La IgA, a diferencia de las demás inmunoglobulinas, no actúa como opsonina, sino que neutraliza toxinas bacterianas e induce aglutinación de la bacteria invasora, dificultando la diseminación bacteriana en la glándula [Korhonen y col., 2000].

Los anticuerpos naturales, también es posible que tengan un rol predominante en la glándula mamaria bovina. Los anticuerpos naturales en suero son del tipo IgG₂ e IgM, pero en leche el isotipo mayoritario es la IgM. Estos anticuerpos son suficientes para opsonizar algunas bacterias, como *E. coli* menos resistentes, sólo durante los primeros estadios de lactancia [Rainard y Riollot, 2006].

Complemento

Los macrófagos activados y las MEC son fuentes importantes de moléculas del complemento y citoquinas [Sordillo, 2005]. Los componentes del complemento ejercen sus funciones biológicas a través de la unión a receptores de complemento ubicados en la superficie de una variedad de células. Estas actividades incluyen lisis de la bacteria, opsonización y reclutamiento de más moléculas fagocíticas [Barrio y col., 2003].

En leche de vacas sanas, se detectan bajas pero significativas concentraciones de complemento, [Sordillo, 2005; Rainard y Riollot, 2006]. En cambio, en calostro, leche proveniente de glándulas infectadas y en secreciones mamarias obtenidas durante la involución de la glándula mamaria, las concentraciones de complemento son altas, posiblemente debido a una difusión de los componentes desde la sangre [Sordillo, 2005]. La vía clásica del complemento no es funcional en la glándula mamaria, debido a la falta de C1q, pero la vía alternativa puede actuar generando deposición de C3b y C3bi sobre la bacteria y produciendo el fragmento pro-inflamatorio C5a que recluta neutrófilos al sitio de infección [Rainard y Riollot, 2006]. A diferencia de lo que ocurre durante infecciones por *E. coli* ó *S. uberis*, la inoculación de glándulas mamarias con *S. aureus* produce reclutamiento de neutrófilos sin detectarse aumentos en la concentración de C5a [Paape y col., 2002]. Esto sugiere que distintos patógenos inducen preferencialmente mediadores y vías de inflamación, ó que el C5a es sólo un estímulo de la inflamación [Paape y col., 2002].

Citoquinas

Las citoquinas son proteínas solubles que afectan una diversidad de procesos biológicos, incluyendo inflamación e inmunidad. Uno de los mecanismos por los cuales ejercen sus funciones, es a través de la activación de mecanismos de transducción de señales intracelulares y la correspondiente regulación positiva de la expresión génica [Gouwy y col., 2005].

La IL-8, secretada por las MEC, es la principal quemoquina que estimula la migración de los neutrófilos hacia la glándula mamaria durante la mastitis bovina [Rainard y Riollot, 2006]. Un estudio llevado a cabo por Wellnitz y col., estimularon cultivos primarios de MEC con *S. aureus* o LPS, y observaron que la secreción de IL-8 era dependiente de la dosis de estímulo y el tiempo [Wellnitz y Kerr, 2004]. Estudios *in vitro* e *in vivo*, demostraron que las IL-1 β e IL-6, son también producidas por las MEC y macrófagos residentes de la glándula mamaria [Okada y col., 1999; Riollot y col., 2000; Bannerman y col., 2004].

Ambas citoquinas son importantes mediadores de la inflamación, incluyendo la activación de células endoteliales y leucocitos y la estimulación de la respuesta a la fase aguda [Rainard y Riollot, 2006]. Algunos estudios en los que tratan glándulas mamarias con G-CSF ó GM-CSF (del inglés “*Granulocytes Colony-stimulating factor*” y “*Granulocytes and Monocytes Colony-stimulating factor*”, respectivamente), resultaron en una fagocitosis y actividad bactericida incrementadas, asociados a una mayor resistencia de la glándula mamaria a los patógenos invasores [Daley y col., 1993; Alluwaimi, 2004]. Los CSF intervienen en la proliferación y diferenciación de una variedad de células madres hematopoyéticas, tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y LT.

La IL-12 se demostró que está incrementada en la leche de bovinos infectados experimentalmente con *S. aureus* [Bannerman y col., 2004]. La interleuquina 12 es una citoquina producida principalmente por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, que actúa como mediador entre la respuesta inmune innata y adaptativa [Trinchieri, 2003]. La IL-12, estimula a los LT y NK para que produzcan IFN- γ contribuyendo a la activación de macrófagos y neutrófilos, favorece la diferenciación de los LT al fenotipo TH₁ y su proliferación [Trinchieri, 2003].

También se ha detectado ARNm del factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés “*Tumoral necrosis factor*”), al infectar cultivos primarios MEC con *S. aureus* ó LPS [Riollot y col., 2000; Bannerman y col., 2004]. En un trabajo reciente, la inmunomarcación de muestras de tejido extraídas de glándulas mamarias en período de involución y con infección crónica de *S. aureus*, detectó cantidades incrementadas de TNF- α , respecto de los controles [Dallard y col., 2009]. El TNF- α es también producido por macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales [Angelini y col., 2005]. TNF- α sirve como mediador rápido de las funciones inflamatorias [Rainard y Riollot, 2006]. El INF- γ es producido por LT activados, siendo una citoquina de importancia en la regulación de la respuesta inmune [Sordillo, 2005]. En la glándula mamaria, INF- γ ejerce funciones sobre otros linfocitos y células fagocíticas. Actúa aumentando la actividad microbicida de macrófagos y neutrófilos, induciendo la actividad de estallido oxidativo, activando la producción de óxido nítrico, y aumentando la expresión de MHC I, para promover la presentación antigénica y eliminación del patógeno [Schroder y col., 2004]. Además, actúa sobre los linfocitos B activados induciendo el cambio de isotipo IgM a IgG₂, favoreciendo así la producción de anticuerpos con mayor capacidad opsónica [Estes, 1996].

Estudios en los que inducen experimentalmente mastitis subclínicas por *S. aureus*, detectan una producción tardía ó ausencia en leche, de citoquinas como IL-8, TNF- α , INF- γ e IL-10, importantes en la inflamación y regulación de las defensa contra los patógenos [Riollot y col., 2000; Bannerman, 2003]. La IL-10 es producida por los CD4+ y LB, y juega un rol central en la restricción de la reacción inflamatoria y regula de manera negativa la expresión de MHC-II, reduciendo la capacidad de los monocitos y macrófagos de presentar antígenos a las células T [Moore y col., 2001]. La observación de que la

persistencia bacteriana en leche está asociada a la ausencia o inducción demorada de las anteriores citoquinas, sugiere la producción temprana de ellas podría ser beneficiosa para que los bovinos logren limitar el crecimiento bacteriano y eliminar al patógeno [Bannerman y col., 2004; Kauf y col., 2007]. Además, la respuesta retardada de las citoquinas pro-inflamatorias y el consecuente reclutamiento tardío y moderado de neutrófilos al sitio de infección, podría explicar los casos menos severos y principalmente del tipo subclínico de las IIM causadas por *S. aureus* [Rainard y Riollet, 2006].

Por último, la IL-2 en la glándula mamaria, mostró tener acción sobre las NK, aumentando su potencia bactericida contra una variedad de patógenos causantes de mastitis [Shafer-Weaver y Sordillo, 1996]. Esta citoquina es producida principalmente por los TH₁ y es responsable del crecimiento los LT efectores y diferenciación a células de memoria, así como de la activación de LB.

Otras proteínas

Otros factores solubles de la defensa innata de la glándula mamaria, incluyen proteínas como la Lactoferrina (Lf), Transferrina y Xantina oxidasa. La Lf es una proteína que quela hierro, ejerciendo una función bacteriostática y de protección contra la generación de radicales del oxígeno catalizada por hierro libre [Rainard y Riollet, 2006]. La lactoferrina es principalmente secretada por las células endoteliales de la glándula mamaria y tiene un rol significativo en la glándula involucionada [Rainard y Riollet, 2006]. Durante la lactancia, se produce citrato como precursor, el cual quela el hierro de la Lf, dejándolo disponible para las bacterias y disminuyendo la acción bacteriostática de la Lf [Smith y Schanbacher, 1977]. Incluso en el período de lactancia, la Lf disminuye y la concentración vuelve a aumentar al cesar la lactancia y durante las mastitis clínica [Rainard y Riollet, 2006]. *S. aureus* es uno de los patógenos de la glándula mamaria más susceptibles a la Lf, debido a sus altos requerimientos de hierro para crecer y sobrevivir.

La transferrina es otra proteína que quela hierro, la cual no es producida en la glándula mamaria de los ruminantes, sino que llega a la glándula sana desde la sangre ó a través de la exudación del plasma durante las mastitis [Rainard y Riollet, 2006]. La Transferrina aportaría acción bacteriostática frente a los agentes patógenos durante el inicio de la infección mientras aumenta la concentración de Lf [Rainard y Riollet, 2006]. Por último, la Xantina oxidasa es una enzima de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche, la cual en condiciones anaeróbicas produce la formación de peróxido nítrico, de efecto bactericida [Rainard y Riollet, 2006].

La lisozima y la lactoperoxidasa, también tienen efectos bacteriostáticos, pero se encuentran en bajas concentraciones ó presentan poca actividad en la leche bovina, por lo cual no tendrían un rol importante en la defensa de la glándula mamaria [Rainard y Riollet, 2006].

I-3. FACTORES Y MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *S. AUREUS*

La mayoría de los autores coinciden en que las infecciones por *S. aureus* consisten en 3 fases: colonización, invasión o penetración y evasión del sistema inmune. Para ello, *S. aureus* posee múltiples factores de virulencia (entre 200-300) que le permiten comportarse como un patógeno extracelular y/o intracelular, produciendo numerosos efectos contra la célula hospedador. La expresión de los genes que codifican para los factores de virulencia de *S. aureus* se encuentra controlada por una red compleja de factores de regulación transcripcional [Novick, 2003]. Durante el cultivo *in vitro* del microorganismo, los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferencialmente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción son liberados en la fase post-logarítmica [Tuchscher y col., 2010]. Se ha propuesto que esta expresión bifásica de los factores de virulencia cumpliría con la función de organizar el proceso de infección [Tuchscher y col., 2010]. Inicialmente, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del hospedador facilitando la colonización, lo cual sería seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas (α , β , γ y δ hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (serin- proteasas, cisteína proteasas, lipasas) [Lowy, 1998]. Sin embargo, se ha postulado que para lograr la persistencia intracelular, *S. aureus* debe evitar la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador, para lo cual regularía negativamente la expresión de factores de virulencia. Esta fina red regulatoria sería la clave en la patogénesis de la infección crónica por *S. aureus*, permitiendo la adaptación del microorganismo a los cambios.

En la mayoría de las enfermedades causadas por *S. aureus* la patogénesis es multifactorial, es decir, los múltiples factores de virulencia actúan de manera coordinada para promover la infección [Capuco y col., 1986; Sordillo y col., 1997]. A continuación se describen los factores de virulencia de *S. aureus* más estudiados hasta el momento.

I-3-1. Proteínas adhesinas

El primer paso en la colonización de la glándula mamaria es la adhesión de la bacteria a las células epiteliales mamarias. El mecanismo no está bien determinado, pero se sabe que varía de una cepa de *S. aureus* a otra y con el origen de la célula [Harmon y Heald, 1982; Sordillo y col., 1997]. Una primera interacción entre la bacteria y las células del hospedador estaría dada por uniones no específicas. La mayoría de las cepas de *S. aureus* provenientes de aislamientos de IIM bovinas tienen una superficie altamente hidrofóbica que podría favorecer la interacción con la membrana celular [Sutra y Poutrel, 1994]. En segundo lugar ocurren interacciones específicas entre proteínas adhesinas (ubicadas sobre la superficie bacteriana) y componentes de la matriz celular ó extracelular del endotelio del hospedador [Sutra y Poutrel, 1994]. Las adhesinas median la unión de la bacteria a las células epiteliales y

microlesiones del epitelio mamario, donde están expuestos la lámina basal y el tejido conjuntivo, ricos en fibronectina (Fn), fibrinógeno (Fg) y colágeno (Cn). En etapas tempranas de la infección, esta adhesión celular evitaría que la bacteria sea barrida por el flujo de leche durante el ordeño y de esta manera se facilita la colonización del pezón y parénquima mamario [Harmon y Heald, 1982; Philpot, 1999].

Las adhesinas incluyen **proteínas de unión a fibronectina** (FnBP), **proteínas de unión a fibrinógeno** (Clf y Efb) y **proteínas de unión a colágeno** (Cna) [Wann y col., 2000; Middleton, 2008]. *S. aureus* posee dos FnBPs, A (FnBPA) y B (FnBPB). La unión de las FnBPs a la Fn también induce la expresión de citoquinas y proteínas inmunosupresoras en el hospedador y dificulta la fagocitosis [Tollersrud y col., 2000]. Entre las proteínas de unión a Fg se han descrito 5 hasta el momento: Clumping factor A y B (ClfA y ClfB), median la adhesión a fibrinógeno y fibrina y la agregación plaquetaria [Sordillo y col., 1997; Revelli y Rodríguez, 2001]. La proteína de unión a fibrinógeno extracelular, Efb, es un potente agente antiplaquetario [Shannon y col., 2006]. La unión de Efb sobre las plaquetas dificulta la unión de ciertos marcadores necesarios para la agregación de las plaquetas, inhibiéndose sus funciones [Shannon y col., 2006]. La Cna, induce la adherencia de la bacteria a sustratos colagénicos y cartílago [Visai y col., 2000]. A diferencia de las demás adhesinas que están presentes en la mayoría de las cepas de *S. aureus*, el gen que codifica para Cna no está presente en todas las cepas, por lo cual no es considerado un buen candidato para el desarrollo de una vacuna [Smeltzer y Gillaspay, 2000]. La unión a colágeno no parece ser un pre-requisito para el establecimiento de una infección, aunque en modelos experimentales de osteomielitis se observó que las bacterias que expresan la Cna resultan más virulentas que las que no la expresan [Smeltzer y Gillaspay, 2000].

I-3-2. Proteína A (SpA)

La SpA es una proteína de superficie, así como también un producto secretado, presente en el 50-60% de las cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas [Sutra y Poutrel, 1994]. Esta proteína juega un papel importante en la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador. Tiene la habilidad de unir IgG a través del fragmento Fc, lo cual impide el reconocimiento de la inmunoglobulina por los PMN y la opsonización mediada por complemento [Philpot, 1999; Smeltzer y Gillaspay, 2000]. La SpA se une débilmente a la IgG₁ bovina y fuertemente a IgG₂ [Goudswaard y col., 1978]. Por lo tanto, esta proteína tiene importancia durante las etapas finales de la IIM, cuando se incrementa el contenido de IgG₂ y neutrófilos en leche, como consecuencia de la propia respuesta inflamatoria [Sutra y Poutrel, 1994]. La proteína A también es un potente inductor la expresión de quemoquinas [Smeltzer y Gillaspay, 2000].

Otro factor de virulencia que la bacteria utiliza para evadir el sistema inmune del hospedador son las toxinas. Las exotoxinas son proteínas en su mayoría extracelulares, que por acción enzimática modifican

o destruyen determinadas estructuras celulares. Las toxinas de *S. aureus* son: **toxina α , β , γ y δ** ; **leucocidina de Panton-Valentine** y la **toxina exfoliativa** [Sordillo y col., 1997; Philpot, 1999].

I-3-3. Exotoxinas

Las toxina α y β (Atox y Btox, respectivamente), parecen cumplir los roles principales en la virulencia de *S. aureus* [Sutra y Poutrel, 1994]. Ambas toxinas son producidas por un gran número de cepas de *S. aureus* [Dinges y col., 2000; Bustos-Martínez y col., 2006]. La Atox es citolítica para distintos tipos celulares, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales [Bustos-Martínez y col., 2006]. La toxina actúa formando un poro que atraviesa la membrana celular, produciendo la lisis osmótica de las células [Sordillo y col., 1997]. La formación de poros también produce diferentes eventos secundarios que incluyen la activación de endonucleasas, excitosis de plaquetas y liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios [Bustos-Martínez y col., 2006]. La Btox es una esfingomielinasa que daña las membranas ricas en esfingomielina [Dinges y col., 2000]. Esta toxina no causa por sí sola la lisis de las células susceptibles, sino que desestabiliza la membrana facilitando la posterior lisis mediada por la toxina δ [Fraunholz y Sinha, 2012]. La toxina δ tiene la capacidad de lisar eritrocitos y otras células mamíferas, así como también organelas unidas a la membrana, protoplastos, y otras organelas subcelulares [Dinges y col., 2000]. Posee además actividad dermonecrótica y puede resultar letal en altas concentraciones [Freer y Birkbeck, 1982]. Lo que se conoce hasta el momento acerca de la función de la toxina γ , es que afecta a neutrófilos, macrófagos y que es capaz de lisar *in vitro* lisosomas, glóbulos lipídicos, mitocondrias, protoplastos y eritrocitos, actuando de manera comparable a los detergentes no-iónicos [Verdon y col., 2009].

La leucocidina de Panton-Valentine es otra toxina que actúa mediante el mecanismo de formación de poros, causando la lisis de los leucocitos, y la consecuente liberación de mediadores de la inflamación y desarrollo de una respuesta inflamatoria grave [Said-Salim y col., 2005]. Se expresa sólo un 2-3% de las cepas de *S. aureus* [Dinges y col., 2000] y se ha asociado principalmente a neumonía necrótica.

Las toxinas exfoliativas (ET) causan una separación de las láminas entre la epidermis facilitando la diseminación de la bacteria a través de los tejidos, provocando síndrome de la piel escalada [Freer y Birkbeck, 1982; Sordillo y col., 1997]. Existen dos isoformas principales, la **ETA** y la **ETB** que son producidas por una 5% de los aislamientos clínicos de *S. aureus* [Lisa y Plano, 2004]. Estas toxinas pertenecen a la familia de las serino-proteasas y actúan clivando la desmogleína-1, una glicoproteína desmosomal que contribuye a la adhesión célula-célula en la epidermis superficial [Freer y Birkbeck, 1982; Said-Salim y col., 2005].

I-3-4. PTSAgs (Pyrogenic Toxin Superantigens)

S. aureus produce una amplia variedad de superantígenos involucrados en infecciones del tipo shock tóxico. Éstos incluyen la **toxina-1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1)** y **enterotoxinas estafilocócicas (SE)**, entre ellas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH y SEI. Cada una de estas toxinas tienen al menos tres propiedades biológicas: pirogenicidad, superantigenicidad y capacidad de incrementar la letalidad de las endotoxinas [Dinges y col., 2000]. Al igual que la mayoría de las proteínas secretadas por *S. aureus*, las PTSAgs se producen principalmente durante la etapa de crecimiento post-exponencial o de crecimiento estacionario [Dinges y col., 2000]. A diferencia de los antígenos convencionales, los superantígenos se unen selectivamente con moléculas del MHC clase II en ausencia de un procesamiento del antígeno, desencadenando la proliferación de células T, tanto CD4⁺, como CD8⁺ [Lisa y Plano, 2004]. Como consecuencia de esta activación se liberan grandes cantidades de monoquinas y linfoquinas, lo que puede resultar en efectos fatales para el hospedador [Dinges y col., 2000]. Específicamente, la TSST-1 de *S. aureus*, suprime la quimiotaxis de neutrófilos, induce la función supresora de los linfocitos T y bloquea el sistema reticuloendotelial [Bustos-Martínez y col., 2006]. Mientras que las ET tienen la habilidad de causar emesis, gastroenteritis, superantigenicidad y de mediar la resistencia al calor y la digestión de pepsina [Dinges y col., 2000]. Los síntomas de las enfermedades están altamente correlacionados con la generación de mediadores inflamatorios (prostaglandina E₂, leucotrienos, etc.), aunque aún no se sabe si éstos mediadores se producen de manera directa o indirecta en respuesta a las enterotoxinas [Dinges y col., 2000].

I-3-5. Endotoxinas

Las endotoxinas son componentes tóxicos de la envoltura (membrana y pared celular) de la célula bacteriana. La endotoxina clásica y más potente es el **lipopolisacárido (LPS)**; a pesar de que *S. aureus* no posee LPS, es capaz de producir los mismos síntomas que las bacterias que sí lo poseen [Fournier y Philpott, 2005]. Las endotoxinas son disparadores no específicos de la inflamación. Por ejemplo, estimulan a las células del sistema inmune, las cuales liberan citoquinas que atraen PMN hacia los ejidos afectados. El **peptidoglicano (PG)**, es el componente estructural de la pared bacteriana, el cual consiste en cadenas disacáridas paralelas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas entre sí a través de un puente de pentaglicina [Fournier y Philpott, 2005]. Se demostró que el PG de *S. aureus* estimula la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias en monocitos y macrófagos, tales como TNF- α , IL-8, IL-6 y IL-1 β [Karakawa y col., 1988; Marrack y Kappler, 1990]. Si bien existen enzimas peptidoglicano hidrolasas presentes en el hospedador implicadas en el clivaje del PG, *S. aureus* es resistente debido que el ácido murámico de su PG está O-acetilado [Fournier y Philpott, 2005]. Esta resistencia podría contribuir a su habilidad para colonizar la piel y mucosas. Finalmente, los **ácidos**

lipoteichoico (LTA) de *S. aureus* producen secreción de numerosas citoquinas y quemoquinas, como ser TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-8, leucotrienos, el factor C5a del complemento, el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), entre otras [Fournier y Philpott, 2005].

I-3-6. Otras Exoenzimas

Otra enzima expresada por muchas de las cepas de *S. aureus* es la **estafiloquinasa**, que lisa fibrina. Se forma un complejo entre la estafiloquinasa y el plasminógeno, lo cual activa la acción proteolítica de éste último, causando la disolución de coágulos de fibrina. No hay evidencias de que esta enzima sea un determinante de virulencia en *S. aureus*, pero se puede pensar que la fibrinólisis localizada podría contribuir a la diseminación de la bacteria [Todar, 2008]. También, la enzima **coagulasa** parecería tener un rol en la evasión del sistema inmune del hospedador. Esta enzima existe en dos formas, una libre y otra como proteína unida a la pared bacteriana. La enzima posee un dominio de unión a protrombina [Sordillo y col., 1997] y una secuencia homóloga al sitio de unión a Fg de la Efb, que le daría la capacidad de unir también fibrinógeno [Wann y col., 2000; Todar, 2008]. En la sangre, la unión de la coagulasa libre a la trombina promueve la actividad proteasa de la trombina, lo cual resulta en la conversión de fibrinógeno a fibrina insoluble y la formación de coágulos de sangre [Todar, 2008]. Mientras que la unión de la coagulasa superficial a la protrombina permitiría cubrir la bacteria con fibrina, formando una aglomeración estafilocócica resistente a la fagocitosis [Sordillo y col., 1997; Visai y col., 2000].

I-3-7. Polisacárido capsular

La mayoría de las especies bacterianas Gram positivas que son patógenas para la glándula mamaria, expresan cápsulas [Oliver y col., 1999]. La cápsula es definida como una capa de polisacárido que recubre a la pared celular [Sutra y Poutrel, 1994]. Entre el 85 y el 95% de las cepas de *S. aureus* son capaces de producir polisacárido capsular *in vivo* o bajo determinadas condiciones de cultivo [Poutrel y Sutra, 1993; Philpot, 1999]. Se ha propuesto la existencia de 11 serotipos de CP aislados, sobre la base de aglutinación con antisuero de conejo adsorbido y precipitación en inmunodifusión doble [Karakawa y col., 1985b; Sompolinsky y col., 1985]. Sin embargo, solamente se han aislado y caracterizado químicamente 4 de ellos (CP1, CP2, CP5 y CP88). CP1 y CP2 son de hallazgo infrecuente entre los aislamientos clínicos por lo que no se consideran virulentas; mientras que los serotipos CP5 y CP8 han sido aislados de infecciones humanas y bovinas en el mundo [O'Riordan y Lee, 2004]. También se describió la presencia de otro tipo capsular, denominado 336, en cepas de *S. aureus* aislados de mastitis bovinas [Han y col., 2000]; no obstante, la estructura química de este polisacárido no ha sido caracterizada. Se ha demostrado recientemente, que los aislados que expresan el polisacárido de superficie 336, poseen los genes para la síntesis de CP5 o CP8 [Verdier y col., 2007].

Se han realizado numerosos estudios de virulencia en los cuales se demuestra que los CPs juegan un rol importante en la patogénesis de la bacteria, contribuyendo a la evasión de la opsonofagocitosis, dificultando la eliminación de la bacteria e incrementando su habilidad para diseminarse y sobrevivir en el torrente sanguíneo y tejidos [Karakawa y col., 1988; Fattom y col., 1998; O'Riordan y Lee, 2004].

I-3-8. Sistema Isd (iron surface determinants)

El sistema Isd, está formado por nueve proteínas (IsdA-I), con un rol fundamental en la adquisición de hierro a partir de grupos hemo. El hierro es un nutriente de vital importancia para la supervivencia de la bacteria, pero en la leche está presente en concentraciones insuficiente para el desarrollo del patógeno [Andrews y col., 2003]. *S. aureus* ha desarrollado este complejo sistema para la captación y adquisición de hierro, el cual sólo se expresa bajo condiciones limitantes del nutriente [Pishchany y Skaar, 2012]. El sistema Isd recibe cooperación de las hemolisinas secretadas por *S. aureus* (Atox, Btox y δ hemolisina), las cuales causan la lisis de los eritrocitos, produciendo la liberación de una gran cantidad de hemoglobina al torrente sanguíneo, a partir del cual las proteínas Isd extraen el hierro [Pishchany y Skaar, 2012].

I-4. DESARROLLO DE MASTITIS EN BOVINOS

I-4-1. Invasión del pezón

La infección comienza cuando los microorganismos presentes en la piel de la ubre o en el ambiente penetran en la glándula mamaria a través del canal del pezón. Si bien la obstrucción del pezón por acción de la queratina es eficiente en los períodos de no lactancia, al acercarse el momento del parto, comienzan a acumularse fluidos en la glándula que aumentan la presión intramamaria [Nickerson, 1987]. Esto produce una dilatación del canal del pezón y el esfínter puede abrirse ocasionando fuga de secreciones mamarias y facilitando el ingreso de patógenos a la glándula mamaria [Nickerson, 1987].

Además de los factores naturales que alteran las defensas del hospedador, el ordeño es una operación crítica en la conservación de integridad de las barreras físicas del pezón. Por un lado, la leche lava el tapón de queratina; mientras que a su vez, los cambios en la presión durante el ordeño (el vacío y flujos discontinuos de leche) también pueden provocar que el canal del pezón se distienda, permitiendo el ingreso de microorganismos presentes en la piel de la ubre ó en el ambiente. Por lo general, las infecciones ocurren de manera independiente en cada cuarto de ubre [Sutra y Poutrel, 1994]. Los principales vectores de transmisión son las manos del personal de ordeño, los accesorios de preparación de las ubres, de limpieza antes y luego del ordeño (toallas, esponjas ó trapos), las pezoneras o mangueras de conducción de leche sucias y las moscas [Philpot, 1999; Castro y col., 2006]. Luego del ordeño, se requieren dos horas para que el esfínter vuelva a contraerse hasta su posición normal y cierre el canal, por lo cual los patógenos pueden invadir fácilmente el canal del pezón y causar una IIM [Rainard y Riollot, 2006].

En las infecciones por *S. aureus*, una vez que la bacteria ingresó a la glándula mamaria, la unión a las células ó proteínas de la matriz extracelular es un paso clave para colonizar y comenzar la infección [Middleton, 2008]. Para esto la bacteria expresa numerosas proteínas adhesinas como proteínas de unión a fibronectina, factores de agregación, proteínas de unión a colágeno, ácidos teichoicos.

I-4-2. Establecimiento de la enfermedad e inflamación

Una vez dentro de la glándula, los microorganismos son muchas veces capaces de evadir las defensas celulares y solubles del hospedador y encuentran condiciones ideales para multiplicarse y colonizar los tejidos, estableciéndose la enfermedad [Figura 3.1-A].

Durante la multiplicación de *S. aureus*, ésta secreta numerosas moléculas que causan un daño directo en el hospedador ó contribuyen a la penetración del tejido. Entre estos factores se destacan las toxinas hemolíticas (α , β , γ y δ), leucocidinas, enterotoxinas, enzimas proteasas, catalasa, lipasa, hialuronidasas

y toxinas que median síndromes tóxicos. La liberación de estas moléculas constituye un estímulo para el reclutamiento de células y mediadores inflamatorios [Figura 3.2-B y C].

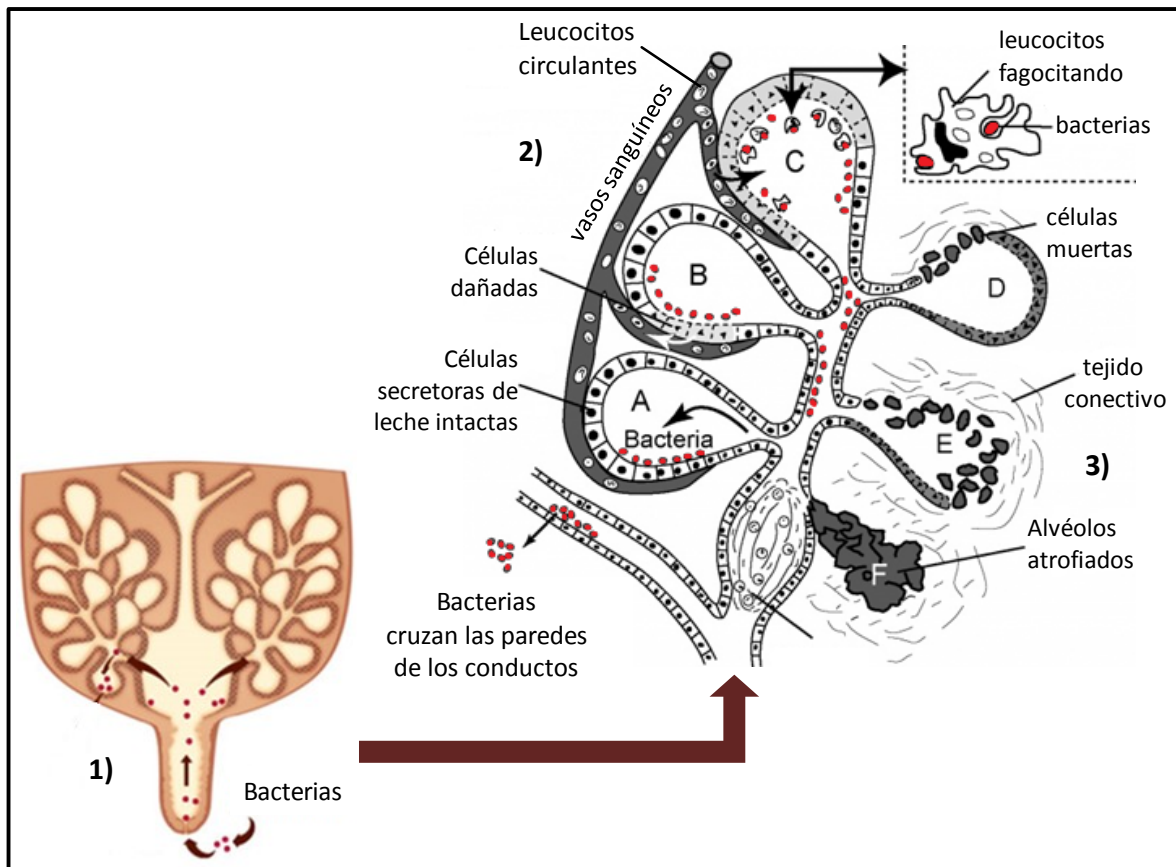


Figura 3. Desarrollo de la IIM y mecanismos de defensa de la glándula mamaria. 1: En condiciones de susceptibilidad de la ubre, las bacterias logran atravesar las barreras anatómicas del pezón, alcanzando las cisternas y zonas alveolares (A). 2: La bacteria secreta toxinas y enzimas que causan daños sobre las células secretoras de leche. Las células dañadas liberan quemoquinas y sustancias que aumentan la permeabilidad de los vasos sanguíneos (B), contribuyendo al reclutamiento de un gran número de leucocitos para que fagociten y destruyan las bacterias (C). Fluidos, minerales y factores de coagulación, también se filtran en el área afectada, con la consecuente formación de coágulos de leche que pueden obstruir los conductos y dejar aisladas las regiones infectadas. Cuando los microorganismos pueden eliminarse rápidamente, se abren los conductos obstruidos y la composición y producción de la leche vuelve a la normalidad. 3: En los casos en que la infección persiste, la leche atrapada en los conductos cerrados, lleva a que las células secretoras entren en un estado de reposo (de no producción) y el alvéolo empieza a reducirse (D). Mediadores inflamatorios, secretados por los propios leucocitos, llevan a la destrucción completa de las estructuras alveolares, la cual es finalmente reemplazada por tejido conectivo y cicatrizante (E y F). Esta destrucción del tejido secretorio, constituye otra línea de defensa de la ubre para controlar las infecciones. [Imagen adaptada de: http://vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/babkoc/23_s.pdf.]

Se mencionó anteriormente que los leucocitos constituyen la segunda barrera de defensa y cumplen un rol determinante en el establecimiento de la IIM [Sandholm y col., 1990]. Si tras el ingreso del patógeno, el reclutamiento de estas células desde el torrente circulatorio hacia el sitio de la infección es rápido y logra eliminar el estímulo inflamatorio (la bacteria), entonces el reclutamiento cesa y el nivel de

leucocitos desciende hasta el valor basal sin ocurrir alteraciones en la composición ó producción de la leche. Pero en el caso de *S. aureus*, la bacteria pone en marcha múltiples mecanismos de evasión del sistema inmune que le permiten progresar hacia la membrana basal de las células epiteliales alveolares, donde terminan internalizándose e invadiendo los alvéolos. Así logran alcanzar una ubicación donde pueden continuar con el proceso infeccioso ó mantenerse en estado de latencia y establecer infecciones persistentes [Capuco y col., 1986]. La proteína A, las cápsulas bacterianas, las toxinas (TSST-1) son importantes factores de virulencia en el escape de la bacteria.

I-4-3. Destrucción del tejido alveolar

En caso de que la infección persista, y los conductos se mantengan tapados, la leche encerrada hace que las células secretoras entren en una etapa de descanso (sin producción) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño [Figura 3.2-D] [Wattiaux, 2001]. La diapédesis prolongada de los leucocitos causa daños en el tejido de la parénquima mamaria y una destrucción completa de las estructuras alveolares, resultando en una disminución importante de la producción de leche [Harmon y Heald, 1982]. Los tejidos dañados son luego reemplazadas por tejido conectivo y cicatrizan [Figura 3.3-E y F] [Sutra y Poutrel, 1994]. La destrucción del tejido secretor de leche es, en efecto, la tercera línea de defensa de la vaca para mantener la infección bajo control [Wattiaux, 2001].

I-5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA MASTITIS BOVINA

I-5-1. Medidas de control

Los planes de control de mastitis bovina tienen como objetivo reducir la duración de las infecciones existentes y reducir la aparición de nuevas infecciones [Hillerton y Berry, 2005; Middleton, 2013]. Una serie de estudios realizados en los '60 por el National Institute for Research in the UK, llevó a desarrollar un Programa de Control de Mastitis basados en medidas de higiene y terapia antibiótica [Dodd y Jackson, 1971]. La higiene durante el ordeño apunta a limitar la diseminación de las IIM en el ganado y las medidas incluyen la utilización de trapos individuales para la limpieza de los pezones, el uso de guantes por el personal de ordeño, la desinfección de los pezones con soluciones antisépticas luego del ordeño y la limpieza adecuada de las máquinas de ordeño [Hillerton y Berry, 2005]. Los antibióticos empleados son de administración intramamaria ó intramuscular, durante la lactancia y el período seco. El tratamiento durante el período seco, tiene por objetivo curar las IIM subclínicas crónicas que pueden hacerse establecido durante la lactancia y prevenir nuevas infecciones [Sutra y Poutrel, 1994]. Procedimientos adicionales de control implican la segregación de las vacas infectadas, el ordeño de dichas vacas luego de los animales sanos, descarte/sacrificio de las vacas crónicamente infectadas y control previo de los nuevos animales adquiridos antes de su inclusión en la población de vacas lecheras [Middleton, 2013]. Todas estas medidas son consideradas exigentes y costosas por los productores, por lo cual no son estrictamente aplicadas en los tambos.

La efectividad de las medidas de control varía entre un 3-37 %, dependiendo del patógeno, el animal, el antibiótico empleado, el momento de aplicación (durante la lactancia, en el período seco ó antes del parto) y la duración del tratamiento [Barkema y col., 2006]. El uso de antibióticos, si bien ha mostrado tener beneficios profilácticos contra la mayoría de los patógenos contagiosos, no resulta del todo efectivo contra *S. aureus*. La terapia antibiótica contribuye a la cura de menos del 50% de las IIM causadas por dicha bacteria. La administración prolongada de antibióticos intramamarios en vacas jóvenes, durante 5-8 días resultan una buena opción para tratar mastitis causada por *S. aureus* [Barkema y col., 2006]. También la administración de antibióticos durante 2-4 semanas antes del parto, ha mostrado cierta eficiencia [Middleton, 2013]. Sin embargo, no son del todo efectivas y, además, pueden contribuir al establecimiento de infecciones clínicas por otras bacterias [Middleton, 2013]. Otra complicación de las terapias extendidas radica en que se trata de protocolos no recomendados por los fabricantes y, por lo tanto, pueden ser usados únicamente bajo control veterinario validado [Middleton, 2013].

La baja eficacia del tratamiento está debida en parte a la aparición de cepas resistentes a antibióticos, y a la localización intracelular de *S. aureus* (en macrófagos ó células epiteliales del hospedador)

volviéndose inaccesible a la acción de los antibióticos [Sutra y Poutrel, 1994]. Sin embargo, el tratamiento con antibióticos continúa siendo una estrategia necesaria para reducir la prevalencia de infecciones por *S. aureus* durante el período seco [Hillerton y Berry, 2005]. Como consecuencia de la alta prevalencia de IIM por *S. aureus*, y la ineficacia relativa de las medidas de control, el desarrollo de vacunas contra la mastitis bovina estafilocócica, es de sumo interés para la industria lechera.

I-5-2. Vacunas

La historia de las vacunas contra la mastitis bovina se remonta a principios del siglo pasado, con el comienzo de los desarrollos de bacterinas para combatir los patógenos ambientales causantes de IIM (*E. coli*, *Klebsiella* spp, *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp y *Pseudomonas* spp) [Mata, 2013]. Tardíamente en los años 80, se reportó los primeros resultados de eficacia en las vacunas contra bacterias coliformes [Gonzalez y col., 1989], las cuales se basan en una bacterina de una cepa mutante de *E. coli*, denominada J5. Está aceptado que esta vacuna no previene la mastitis, pero logra reducir en un 70 a 80% la casuística clínica siguiendo un programa de tres vacunaciones (60 y 30 días antes del parto, y la tercera al momento del parto). Esto constituye la base del análisis costo-beneficio del uso de vacunas en los Estados Unidos [Denis y col., 2009]. Otras vacunas disponibles en el mercado son Upjohn J-5 Bacterin® (Pfizer Animal Health), Mastiguard™ (Bayer), J-Vac® (Merial), Endovac-Dairy® (IMMVAC) y J-5 Shield™ (Novartis Animal Health) [Mata, 2013].

El desarrollo de vacunas contra las IIM causadas por *S. aureus* no ha sido tan exitoso. Si bien se han evaluado varias vacunas y logrado numerosos avances en referencia a los mecanismos de virulencia bacterianos y de defensa de la glándula mamaria, aún no se ha logrado una vacuna eficaz. Las vacunas comerciales disponibles actualmente, son pocas, y ninguna logra prevenir las infecciones. La única vacuna disponible contra la mastitis causada por *S. aureus* en Estados Unidos se denomina Lysigin™ (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc). Se trata de un lisado pentavalente de bacterias inactivadas, correspondientes a los 3 serotipos de mayor prevalencia en dicho país, serotipos 5, 8 y 336 [Middleton, 2008]. Existen resultados discordantes en cuanto a la eficacia de Lysigin™. Uno de los primeros estudios experimentales en el que se evaluó la vacuna en bovinos, los animales vacunados y desafiados con *S. aureus*, tuvieron menores síntomas clínicos, más bajos recuentos de RCSs y desarrollaron menos casos de mastitis crónica, respecto de los animales vacunados [Williams y col., 1966; Williams y col., 1975]. Sin embargo, en el ensayo a campo, los resultados sólo evidenciaron una disminución de los síntomas de las IIM [Williams y col., 1966]. Middleton y col., realizaron otra prueba donde inmunizaron vaquillonas primíparas con Lysigin™ y las desafiaron con *S. aureus* [Middleton y col., 2006]. La vacunación sólo permitió disminuir significativamente la duración de la mastitis clínica y los síntomas de la enfermedad respecto del grupo control, aunque no se detectaron diferencias en los RCSs, los rendimientos en la

producción de leche, o en los niveles de anticuerpos opsonizantes. El posterior estudio de campo empleando vaquillonas en lactancia (con múltiples pariciones), no mostró siquiera la capacidad de la vacuna de aminorar los síntomas de la infección [Middleton y col., 2006]. Contrariamente a los ensayos anteriores, Nickerson y col., vacunaron vaquillonas de 6 meses de edad con múltiples dosis hasta el momento del parto [Nickerson y col., 1999]. El grupo vacunado presentó un 45% menos de nuevas IIM, tanto durante la preñez como en el parto. Los resultados sugieren que Lysigin™ podría ser eficaz para controlar la mastitis bovina cuando se la administra en múltiples dosis antes del parto, aunque faltarían ensayos a campo con más números de animales para corroborar estos resultados.

Otra vacuna disponible comercialmente es Startvac™ (HIPRA S.A). De todas las vacunas contra la mastitis bovina nombradas previamente, es la única utilizada en Reino Unido [Mata, 2013]. Consiste en una formulación polivalente basada en la cepa *E. coli* J5 y una cepa CP8 de *S. aureus*, ambas inactivadas [Mata, 2013]. Recientemente (2009-2010) se realizó una prueba de campo natural en el que inmunizaron vaquillonas con dos dosis de Startvac™ pre-parto [Ribeiro]. La vacunación produjo una disminución en el RCSs y de la severidad de los casos clínicos y subclínicos de mastitis, pero el estudio no permite sacar conclusiones en cuanto a la prevención de nuevas IIM.

Se han realizado numerosos intentos por mejorar las vacunas basadas en bacterinas, mediante la incorporación de los toxoides ó cápsulas y pseudocápsulas bacterianas de *S. aureus*, los cuales sólo quedaron en etapas experimentales ó fallaron en las últimas fases de desarrollo. Watson y col. desarrollaron una vacuna compuesta por *S. aureus* inactivada, crecida bajo condiciones de cultivo que favorecen la expresión de pseudocápsulas y combinada con toxoides de la bacteria [Watson, 1992]. Distintos estudios de desafíos experimentales (aproximadamente 500 animales) demostraron que la vacuna es efectiva en reducir IIM en vaquillonas lecheras, pero el escalado del ensayo a un mayor número de animales (aprox. 1800) dicha reducción no resultó significativa respecto del control [Yancey, 1999]. De manera similar al desarrollo anterior, otra formulación compuesta por bacterias enteras suplementadas con pseudocápsulas y formas no tóxicas de Atox y Btox, produjo una disminución de los casos clínicos y subclínicos en el grupo de vaquillonas vacunas (n=108), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa comparado con los animales control [Nordhaug y col., 1994b].

De los antecedentes anteriores, se puede concluir que a pesar de los numerosos intentos de desarrollar vacunas contra *S. aureus*, no se ha logrado el objetivo principal de cualquier estrategia de vacunación: obtener protección contra nuevas infecciones [Sutra y Poutrel, 1994]. En pocos de estos experimentos, apenas lograron reducir la severidad clínica de las IIM. Se ha adjudicado la falta de éxito de dichos desarrollos a tres causas posibles: la falta de conocimiento acerca de los mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina, la expresión diferencial de antígenos entre las bacterias crecidas *in vitro* e *in vivo*, y la carencia de esquemas adecuados de inmunización [Sutra y Poutrel, 1994].

I-5-2-1. Vacunas a subunidades

El desarrollo de una vacuna contra una infección bacteriana requiere de un conocimiento claro de los factores de virulencia involucrados en la infección. Los grandes avances en la genética molecular han permitido el aislamiento de genes específicos de bacterias patógenas, la elucidación de las estructuras y funciones de las proteínas que dichos genes expresan y la modificación de su expresión. La aplicación de estas herramientas moleculares al estudio de cepas de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas, ha contribuido a profundizar el conocimiento acerca de los factores de virulencia de la bacteria y los roles en la patogenicidad bacteriana. A partir de dichos estudios, se abrió un abanico de posibles candidatos vacunales y los trabajos destinados a evaluar la inmunogenicidad de esas moléculas crecieron exponencialmente. Algunos de los potenciales candidatos incluyen moléculas adhesinas (Clf, FnBPs), polisacáridos capsulares (CP5, CP8), otros polisacáridos asociados a superficie (PNAGs), toxinas (Atox y Btox); enterotoxinas (SEA, SEB, SEC)], proteínas involucradas en el metabolismo del hierro (Isds), proteínas repetitivas en serino-aspartato (Sdrs), formulados como vacunas a subunidades, multicomponentes, a DNA y en distintos modelos animales [Gilbert y col., 1994; Tollersrud y col., 2001; Brouillette y col., 2002; Shkreta y col., 2004; Maira-Litran y col., 2005; Kuklin y col., 2006; Schaffer y col., 2006; Stranger-Jones y col., 2006; Chang y col., 2008; Tuchscher y col., 2008; Adhikari y col., 2012; Chen y col., 2012]. Muchos de estos desarrollos experimentales se analizan en distintos trabajos de revisión de vacunas contra *S. aureus* [Middleton, 2008; Pereira y col., 2011], y algunos son detallados en los siguientes capítulos de esta tesis.

Lograr una vacuna efectiva contra las IIM causadas por *S. aureus* aún implica un desafío, debido a las características únicas tanto de la virulencia bacteriana, como del sistema inmune de la glándula mamaria. Sin embargo, los nuevos enfoques en la investigación de los factores de virulencia de la bacteria y el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, han contribuido a avanzar en el diseño de vacunas contra *S. aureus*. Los antecedentes previos de investigación en el tema, y los múltiples y redundantes factores de virulencia de *S. aureus*, llevaron a proponer algunos lineamientos para el diseño de una vacuna eficaz contra la mastitis bovina. La patogenicidad de la bacteria es multifactorial y debida a factores que evitan la fagocitosis (cápsulas polisacáridas), toxinas que causan daños, adhesinas y otras numerosas moléculas asociadas a la pared celular, que causan directamente la enfermedad ó que facilitan la invasión de los tejidos y el reclutamiento de células inmunes [Chen y col., 2012]. Por lo tanto, la vacuna debe ser multicomponente, incluyendo polisacáridos de superficie, toxoides y proteínas asociadas a la pared celular [Middleton, 2008; Anderson y col., 2012; Pozzi y col., 2012]. A su vez, los antecedentes llevan a establecer que los mejores niveles de protección se logran con vacunas producidas empleando nuevas tecnologías, ya sea inmunización génica ó proteínas recombinantes [Pereira y col., 2011]. Esto se ha reflejado en distintos trabajos realizados en bovinos [Carter y Kerr, 2003; Shkreta y col., 2004; Nour El-Din y col., 2006]. Sumado a esto, se han reportado algunos trabajos

en los que demostraron que los anticuerpos generados contra la bacteria entera no son funcionales. Hawkins y col., estudiaron la capacidad de inhibición de la unión a Fg de los anticuerpos generados contra ClfA nativa ó recombinante [Hawkins y col., 2012]. Para esto inmunizaron conejos con la proteína recombinante ó con la bacteria entera productora de ClfA, inactivada por calor. En los ensayos de inhibición de la adherencia a Fg, sólo los sueros de los animales inmunizados con la recombinante inhibieron significativamente la unión de distintas cepas de relevancia clínica; mientras que los sueros obtenidos con la bacteria entera no produjeron inhibición, en ninguna dilución ni tiempos experimentales ensayados. De manera similar, Higgins y col., determinaron que la exposición natural ó la infección con *S. aureus* genera anticuerpos contra ClfA que no son capaces de promover la fagocitosis de la bacteria por PMN humanos [Higgins y col., 2006]. En cambio, la inmunización con la proteína recombinante sí induce la producción de anticuerpos opsonofagocíticos. Los trabajos anteriores concuerdan con antecedentes previos, en los que animales con una historia de infecciones por *S. aureus* no adquieren inmunidad protectora. Se ha propuesto que *S. aureus* suprimiría el desarrollo de la inmunidad adaptativa del hospedador, dificultando el desarrollo una respuesta humoral robusta [Kim y col., 2011]. Esto pone un obstáculo para el desarrollo de vacunas basadas en bacteria enteras y refuerza la importancia de las vacunas a subunidades recombinantes.

Más allá de los mejores resultados con las vacunas a subunidades recombinantes, éstas presentan ventajas interesantes respecto a las basadas en microorganismos enteros. El gen que codifica para el antígeno es transferido a un organismo heterólogo no patogénico, permitiendo que el proceso de obtención se independice del agente patógeno. En consecuencia, la producción de éstas vacunas es más segura y la toxicidad para el individuo/animal inmunizado es reducida o nula. A su vez, la estrategia de clonado permite recurrir al uso de etiquetas de afinidad que facilitan y reducen los pasos de purificación, genes de fusión que mejoran la inmunogenicidad de las moléculas, optimizando el proceso de producción y la calidad de las moléculas producidas. Además, los altos rendimientos de la producción recombinante constituyen otra ventaja respecto de la purificación de las moléculas a partir del microorganismo original. En la actualidad, las subunidades recombinantes dominan la investigación orientada a la búsqueda de nuevas vacunas y reemplazo de las vacunas ya existentes.

I-6. Hipótesis de trabajo

Dada la problemática de la mastitis bovina causada por *S. aureus* en el ámbito de la industria láctea y la falta de tratamientos eficientes contra la bacteria, el objetivo principal de los investigadores es desarrollar una vacuna eficaz. Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos por lograr una vacuna eficaz, los múltiples factores de virulencia de *S. aureus* y las particularidades del sistema inmune de la glándula mamaria, dificultan alcanzar dicho objetivo. En este contexto, proponemos desarrollar un prototipo de vacuna multicomponente para controlar infecciones causadas por *S. aureus*. Nuestra hipótesis de trabajo es que, incorporando diferentes moléculas de importancia en el desarrollo de la infección y formulándolas con un adyuvante adecuado, podemos mejorar las formulaciones vacunales que hasta el momento no han sido satisfactorias. Dicha formulación debería estar compuesta por inmunógenos representativos de las cepas contra las cuales se quiere proteger y que intervengan en distintas etapas de la infección, de manera de generar protección a distintos niveles. La presencia de anticuerpos anti-adhesinas son relevantes para bloquear la invasión de los tejidos durante los primeros estadios de la infección [Nordhaug y col., 1994a]. Si la bacteria logra evadir el sistema inmune del hospedador y colonizar los tejidos, cobran importancia los anticuerpos dirigidos contra las cápsulas bacterianas, toxinas y proteínas metabólicas, que juegan un rol primordial en la evasión del sistema inmune, defensa contra la bacteria, evitando los daños locales, dificultando la supervivencia de la bacteria y diseminación hacia los tejidos [Anderson, 1976; Nordhaug y col., 1994b]. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se propone utilizar a los factores de virulencia bacteriana como lo son las proteínas adhesinas **CfA y FnBPA**, los polisacáridos bacterianos **CP5 y CP8**, las hemolisinas **Atox y Btox**, y la proteína **IsdH** que interviene en el metabolismo del hierro. Una vacuna multicomponente compuesta por dichos inmunógenos y formulados con un adyuvante adecuado, podría contribuir al desarrollo de una respuesta humoral robusta, capaz de impedir / obstruir los mecanismos de virulencia de mayor relevancia durante el desarrollo de las infecciones por *S. aureus*.

I-7. OBJETIVOS

I-7-1. Objetivo general

Desarrollar un prototipo de vacuna a subunidades destinadas al control de infecciones causadas por *S. aureus*.

I-7-2. Objetivos específicos

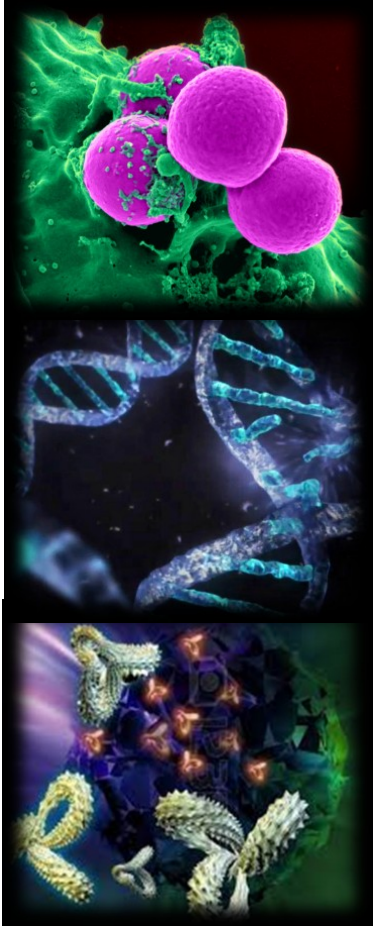
I-7-2-1. Conjugar los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 de *S. aureus* a una proteína transportadora, empleando una técnica conveniente para un futuro escalamiento del proceso de producción.

I-7-2-2. Evaluar la inmunogenicidad de los conjugados obtenidos mediante un protocolo de inmunización y desafío de ratones.

I-7-2-3. Obtener mediante la tecnología del ADN recombinante, fragmentos inmunogénicos correspondientes a las proteínas de adhesión FnBP A y Clf A, las toxinas de secreción β -hemolisinas y α -hemolisina y la proteína metabólica IsdH de *S. aureus*.

I-7-2-4. Evaluar la capacidad de cada uno de los antígenos proteicos de desarrollar una respuesta de anticuerpos funcional en ratones.

I-7-2-5. Combinar los antígenos obtenidos en una formulación multicomponente y evaluar en bovinos el desempeño como inmunógeno.



Capítulo II

Desarrollo de conjugados polisacárido- proteína basados en CP5 y CP8 de *S. aureus*

II-1. INTRODUCCIÓN

II-1-1. Serotipos capsulares CP5 y CP8 de *S. aureus*

Como se mencionó previamente en el capítulo I, los serotipos CP5 y CP8 de *S. aureus* son los más frecuentemente encontrados en infecciones humanas y bovinas en muchas partes del mundo [O’Riordan y Lee, 2004]. Estas cepas son microencapsuladas, y forman colonias no mucoides, compactas en medio sólido, que resultan indistinguibles de las colonias generadas por cepas no encapsuladas [Sutra y Poutrel, 1994; O’Riordan y Lee, 2004]. CP5 y CP8 tienen estructuras químicas muy similares, compuestas por los mismos 3 azúcares acetiladas [Figura 4] [Jones, 2005]. Los genes responsables de la síntesis de CP5 y 8 de *S. aureus*, son cromosómicos y alélicos y conforman un locus de 16 genes (*cap5(8)A- cap5(8)P*) [Tuchscher y col., 2010]. De estos genes, 12 son casi idénticos, mientras que los otros 4 (*cap5(8)HIJK*) poseen un marco abierto de lectura que determina el tipo capsular que será sintetizado [Tuchscher y col., 2010].

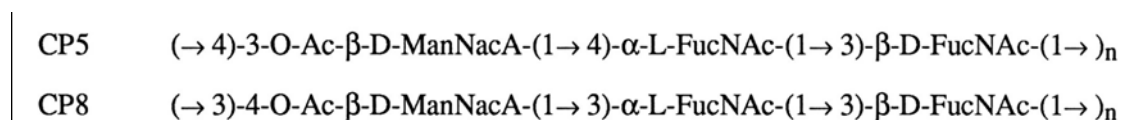


Figura 4. Estructura química de los polisacáridos capsulares CP5 y CP8 de *S. aureus*. Están compuestos de 3 azúcares: D-NAc-Manosa, D-NAc-Fucosa y L-NAc-Fucosa, variando en los tipos de enlaces entre los azúcares y las posiciones de O-acetilación de los residuos de manosa.

Si bien las cepas CP5 y CP8 son las de mayor prevalencia, hay una gran variabilidad en los porcentajes según la región geográfica [Tabla 1]. En un estudio previo, llevado a cabo en conjunto entre Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA, Rafaela) y el Laboratorio de Tecnología Inmunológica (FBCB, UNL), se evaluó por PCR la presencia de los locus capsulares *cap5* y *cap8* en 157 *S. aureus* aislados de mastitis clínicas y subclínicas; pertenecientes a las provincias de Santa Fe (n=91), Buenos Aires (n=31), Córdoba (n=22) y Entre Ríos (n=13) [Camussone y col., 2012]. El 64% de los aislamientos presentó genotipos capsulares, resultando el 53% CP5 y el 11% CP8. De estos aislados con genotipo *cap5* o *cap8*, sólo el 50% fue capaz de producir las cápsulas *in vitro*, resultando un 38,6% de fenotipo CP5 y un 11,9% CP8. En otro estudio reciente, desarrollado en el Laboratorio de Tecnología Inmunológica (FBCB, UNL), se caracterizaron genótipica y fenotípicamente aislados de mastitis clínicas y subclínicas provenientes de Argentina (n= 153), Chile (n= 55) y Uruguay (n= 26) [Ambroggio, 2013]. El 100 % de los aislamientos chilenos y uruguayos y el 96,1 % de los aislamientos argentinos poseían los genes *cap5* u *cap8* [Ambroggio, 2012]. En Argentina y Chile el genotipo 5 resultó el más prevalente (respectivamente el 54,9 % y 67,3 %), mientras que el genotipo 8 se detectó en la mayoría de las muestras provenientes de

Uruguay (65,4 %) [Ambroggio, 2012]. Al igual que en el trabajo de Camussone y col, encontraron altos porcentajes de aislamientos *cap5(8)* positivos, que no pudieron ser caracterizados fenotípicamente. Los porcentajes de aislamientos NT fueron del 62,1% en Argentina, 76,4 % en Chile y 84,6 % en Uruguay respectivamente [Ambroggio, 2012]. Estudios de caracterización de los aislamientos bovinos NT provenientes de Argentina, encontraron la presencia de un elemento de inserción, denominado *I*Scap, ubicado dentro del locus *cap5(8)* [Tuchscher y col., 2007; Ambroggio, 2012]. Estos resultados llevaron a suponer que, al menos parte de los aislamientos NT, pertenecían al fenotipo encapsulado y que la inserción del *I*Scap, ocasionaba la delección de gran parte del locus *cap5(8)*, provocando la pérdida de la expresión de las cápsulas en dichas cepas.

Tabla 1. Prevalencia de los serotipos CP5 y CP8 en diferentes regiones del mundo

| País/ Zona geográfica | N° aislamientos | Serotipificación | | | Caracterización genotípica | | | Referencias |
|-----------------------|-----------------|------------------|---------|---------|----------------------------|---------|--------|------------------------------------|
| | | CP5 (%) | CP8 (%) | NT* (%) | CP5 (%) | CP8 (%) | NT (%) | |
| Francia | 212 | 51,4 | 18 | 30,6 | ND* | ND | ND | <i>Poutrel y col., 1988</i> |
| Estados Unidos | 273 | 18 | 23 | 59 | ND | ND | ND | <i>Guidry y col., 1997</i> |
| Europa | 274 | 12 | 51 | 37 | 9,1 | 9,1 | 81,8 | <i>Tollersrud y col., 2000 (a)</i> |
| Estados Unidos | 362 | 15 | 27 | 58 | 2,4 | 0 | 97,6 | <i>Tollersrud y col., 2000 (b)</i> |
| Argentina | 195 | 7,1 | 6,6 | 86 | 37,5 | 0 | 62,5 | <i>Sordelli y col., 2000 (c)</i> |
| Argentina | 15 | ND | ND | ND | 46 | 0 | 54 | <i>Reinoso y col., 2008</i> |
| Argentina | 157 | 38,6 | 11,9 | 49,5 | 53 | 11 | 36 | <i>Camussone y col., 2012 (d)</i> |

*NT: no tipificable. *ND: no determinado. La caracterización genotípica se realizó sobre: (a) 11 de los aislamientos NT, (b) 42 de los aislamientos NT, (c) el total de los aislamientos NT, (d) Se realizó primero la genotipificación y luego la fenotipificación sobre los aislamientos positivos.

Teniendo en cuenta los anteriores trabajos, puede determinarse que la caracterización genotípica es altamente significativa debido a que varios factores involucrados en la expresión de la cápsula no han sido completamente definidos, y su expresión *in vivo* no se correlaciona necesariamente con la expresión bajo condiciones *in vitro*. Se ha demostrado que la máxima producción de la cápsula se alcanza durante la fase post-exponencial ó de crecimiento estacionario de la bacteria [Guidry y col., 1998; Cunnion y col., 2001]. Sin embargo las condiciones de cultivo, influyen de manera determinante sobre la producción de la cápsula. El crecimiento en medios de cultivos sólidos, la presencia de leche, condiciones limitadas de hierro ó los medios suplementados con NaCl en concentraciones no mayores al 5%, son algunas de las características que contribuyen a incrementar la expresión de la cápsula [Sutra y Poutrel, 1994; Jones, 2005]. De la misma manera, la expresión de las cápsula es influenciada por el ambiente *in vivo*, ya que diversos estudios realizados sobre diferentes modelos de infección

estafilocócica demostraron que los niveles de expresión de los CP5 y CP8 variaban según el tipo de tejido implicado [Herbert y col., 1997; O'Riordan y Lee, 2004].

II-1-2. Rol de CP5 y CP8 en la virulencia de *S. aureus*

El descubrimiento de la presencia de polisacárido capsular en las cepas de *S. aureus* aisladas de IIM y su importancia en la patogénesis bacteriana, convirtieron a este factor de virulencia en nuevo candidato para el desarrollo de vacunas e inmunoterapias contra la bacteria [Fattom y col., 2004]. Por este motivo, numerosos trabajos de investigación buscan estudiar profundamente estas cápsulas bacterianas, para un mejor entendimiento del mecanismo de virulencia que éstas median y así determinar la importancia de incorporarlas o no a un inmunógeno [Fattom y col., 1998; Soltys y Quinn, 1999; Hall y col., 2003; Fattom y col., 2004; O'Riordan y Lee, 2004].

La expresión de la cápsula por *S. aureus* durante la IIM ha sido claramente demostrada [Sutra y Poutrel, 1994]. Los CPs confieren resistencia a la fagocitosis por neutrófilos (PMN) bovinos [Sutra y col., 1990; Guidry y col., 1991], la cual es considerada la principal línea de defensa de la glándula mamaria frente a patógenos invasores [Paape y col., 2002]. Los anticuerpos dirigidos contra los CP tienen un efecto protector ya que son capaces de opsonizar cepas encapsuladas de *S. aureus*, favoreciendo la fagocitosis por PMN [Sutra y col., 1990]. Estudios de interacción entre componentes del complemento y las cápsulas demostraron la importancia de la actividad del complemento durante las infecciones por *S. aureus*. En un trabajo llevado a cabo por Cunnion y col., desafiaron ratones *knock out* para C3 y ratones control (capaces de expresar el C3) con bacterias del serotipo 5 de *S. aureus* [Cunnion y col., 2001]. Mientras que sólo el 8 % de los animales control resultaron infectados, el 64% de los animales que carecían del C3 murieron. Experimentos posteriores realizados por el mismo grupo de trabajo, revelaron que las cepas encapsuladas del serotipo 5, tienen disminuida en un 42% la capacidad de unir C3, respecto de las cepas mutantes cápsulas negativas. A su vez, demostraron que la cápsula enmascara los fragmentos C3 unidos a la superficie de la bacteria, impidiendo la interacción con receptores presentes en anticuerpos y PMN [Cunnion y col., 2003].

Se ha estudiado también la influencia de la producción de la cápsula en la adherencia de *staphylococcus* a las células del endotelio. Se encontró que dicha adherencia es máxima durante la fase logarítmica de crecimiento, cuando la producción de CP5 es mínima, mientras que en la fase estacionaria del ciclo de crecimiento bacteriano la expresión del polisacárido capsular es máxima y la capacidad de adherencia de la bacteria se ve disminuida. Los datos sugieren que la expresión de CP5 y CP8 enmascara las adhesinas presentes en la superficie celular impidiendo la unión de la bacteria a las células endoteliales [O'Riordan y Lee, 2004; Tuchscher y col., 2010]. Esto confirma la hipótesis que supone que durante los estadios tempranos de la infección *S. aureus* expresa proteínas de adherencia que le permiten fijarse al

endotelio de la glándula mamaria y colonizar tejidos [Tuchscher y col., 2010]. Al exponerse a la leche, la bacteria puede expresar CPs, lo que inhibe la adherencia, le permite diseminarse fácilmente y dificulta la fagocitosis [Fattom y col., 1998]. En consecuencia, las bacterias encapsuladas son más propensas a sobrevivir en el torrente sanguíneo, la expresión de la cápsula es esencial para la diseminación de la bacteria desde el foco de infección y contribuye a la capacidad invasiva de *S. aureus*. Mientras que las variantes NT son adherentes, capaces de internalizarse, invadir y persistir dentro del tejido del hospedador, causando infecciones crónicas [Tuchscher y col., 2010].

II-1-3. Vacunas basadas en polisacáridos capsulares

Las cepas encapsuladas interfieren con la opsonización por complemento y son pobremente fagocitadas, lo cual convierte a los polisacáridos capsulares en interesantes candidatos vacunales. Un inconveniente a la hora de incorporar estas moléculas a una vacuna es que constituyen antígenos T-independientes y no producen aumento de inmunoglobulinas tras múltiples dosis [Fattom y col., 1995a; O'Riordan y Lee, 2004; Lee y col., 2005]. El entendimiento de los mecanismos involucrados en el establecimiento de una respuesta B de memoria, condujo a las estrategias de conjugación de polisacáridos a proteínas transportadoras para lograr una alta producción de anticuerpos anti-polisacáridos y generación de memoria inmunológica [Giraud y col., 1997; Guidry y col., 1998; Jones, 2005]. Hay numerosos trabajos que emplean esta estrategia para generar inmunidad contra distintos microorganismos capsulados y actualmente las vacunas comerciales para inmunoprofilaxis contra haemophilus y gonococo se fabrican según este fundamento. Por ejemplo Menjugate[®], Meningitec[®] 65 and NeisVac-C[®] 66, son vacunas monovalentes compuestas por MenC; Menactra[®], Menveo[®] and Nimenrix[®] 67 son tetravalentes y contienen a los serogrupos A, C, Y y W135; y Menitorix 68 se trata de una combinación de conjugados de Haemophilus influenzae b y MenC [Borrow y col., 2013].

En cuanto a las vacunas conjugadas contra *S. aureus*, Fattom y col. trabajaron muchos años en una vacuna compuesta por conjugados CP5 y CP8 destinada a pacientes en hemodiálisis, altamente susceptibles a las infecciones por *S. aureus* [Fattom y col., 1990; Fattom y col., 1993]. Este desarrollo, denominado StaphVax, fue el primero en alcanzar la fase III de prueba (fase clínica), pero falló en esta etapa [Fattom y col., 2004]. Sin embargo, la población a la que era destinada dicha vacuna era inmunocomprometida por lo que dicho ensayo no invalida la efectividad de la conjugación de polisacáridos para la inmunoprotección contra *S. aureus*. En el campo experimental se han empleado diferentes técnicas de conjugación y diversas proteínas para generar conjugados de CP5 y CP8 de *S. aureus*, los cuales resultaron inmunogénicos en distintos modelos animales [Nordhaug y col., 1994b; Leitner y col., 2003; Lee y col., 2005]. La inmunización de bovinos con polisacáridos capsulares conjugados ha sido efectiva para generar anticuerpos de tipo IgG₁ e IgG₂, importantes por su actividad opsonofagocítica [Gilbert y col., 1994; Herbelin y col., 1997; Tollersrud y col., 2001]. Sin embargo, hasta

el momento no se ha logrado una vacuna basada en estos antígenos, que resulte eficiente para proteger contra las IIM causadas por *S. aureus*, y las formulaciones basadas en bacterias enteras han sido mejores inmunógenos para la inmunización de bovinos [Tollersrud y col., 2001]. Esto sugiere la necesidad de seguir trabajando en la optimización de un diseño vacunal que logre mejorar las respuestas inmunes obtenidas con los inmunógenos basados en los CPs de *S. aureus*.

II-1-4. Técnicas de conjugación

Los desarrollos nombrados en el apartado anterior emplean diferentes técnicas de conjugación. Entre las metodologías más comúnmente usadas se encuentran la aminación reductiva, conjugación con cistamina y SPDP (succinimidil 3-(2-piridiltio) propionato), y la técnica del CDAP (1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio). En el apéndice AI-1-1- AI-1-4, se describen brevemente los mecanismos de reacción de estas técnicas. La diversidad en metodologías empleadas se debe a que la magnitud de la respuesta inmune generada por un conjugado depende de varios factores que tienen que ver con la técnica de conjugación, y las moléculas a unir [Lee y col., 2005]: Peso molecular del conjugado, inmunogenicidad de la proteína transportadora, longitud de las moléculas de polisacárido, tipo de unión entre las dos moléculas a unir y presencia de brazos espaciadores y grado de sustitución de la proteína con el polisacárido.

Todas estas técnicas son muy complejas, muy laboriosas y utilizan reactivos costosos. Por lo tanto, se requieren métodos alternativos, más simples, baratos y fáciles de escalar [Klein Klouwenberg y Bont, 2008]. En este trabajo conjugamos el CP5 de *S. aureus* a la albúmina sérica humana (ASH), empleando una técnica que utiliza *para*-benzoquinona (PBQ) como reactivo de acoplamiento y evaluamos el potencial aprovechamiento para la preparación de conjugados inmunogénicos. Esta técnica no había sido evaluada previamente para la preparación de inmunógenos destinados a vacunas. La conjugación consiste en dos simples reacciones sucesivas de oxidación [Figura 5]: primero la PBQ se une a la proteína transportadora formando un intermediario hidroquinona reactivo (ASH-PBQ) [Brandt y col., 1975]. En un segundo paso, el polisacárido se une a dicho intermediario dando lugar al conjugado, el cual consiste en una hidroquinona sustituida en los carbonos 2 y 5 (2,5-hidroquinona) [Brandt y col., 1975; Tijssen, 1993a]. Elegimos esta técnica, ya que está descrita como una reacción muy fácil de realizar, reproducible y económica [Brandt y col., 1975], lo que la hace atractiva para la producción de vacunas comerciales.

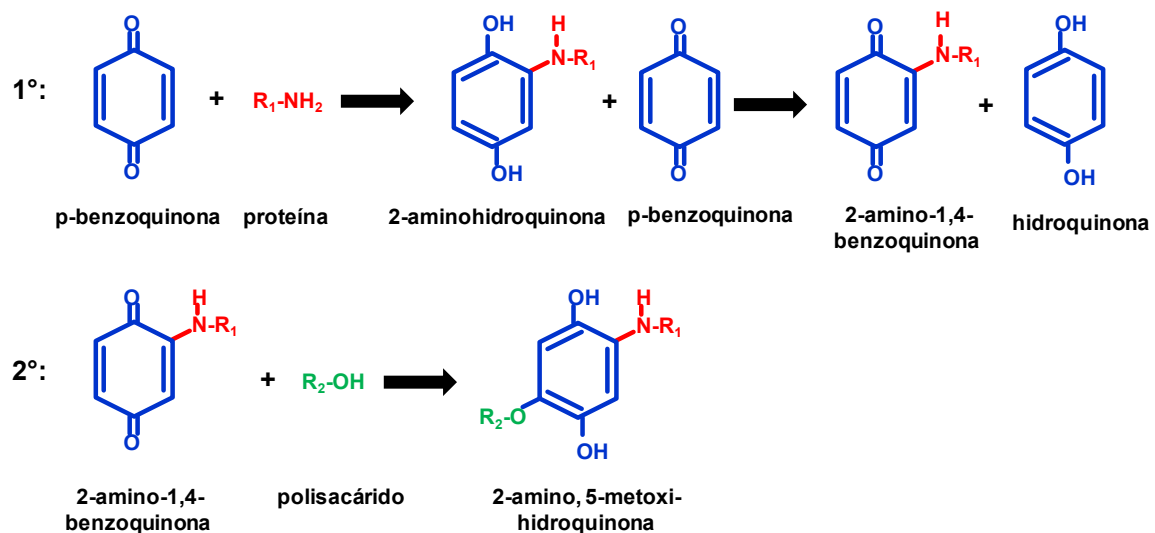


Figura 5. Esquema probable de conjugación mediante la técnica de la *p*-benzoquinona. [Adaptado de Brandt y col., 1975 y Tijssen, 1993].

II-2. MATERIALES Y MÉTODOS

II-2-1. Obtención de los polisacáridos CP5 y CP8 de *S. aureus*

II-2-1-1. Cepas de *S. aureus*

Se utilizaron dos cepas de referencia de *S. aureus*, productoras de CP5 (Reynold) o CP8 (Becker), pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología del Área de Investigación en Producción Animal (A.I.P.A.) de la EEA Rafaela. Estas cepas fueron aisladas en 1979, en el Hospital permanente Kaiser, California [Karakawa y Vann, 1982] y fueron cedidas gentilmente por el Dr. B. Poutrel (INRA, Nouzily, France). Para conservar la cepa durante largos períodos de tiempo, una colonia aislada se sembró en caldo tripteína soya (CTS), y se incubó toda la noche a 37°C. Se transfirieron 750 µl del cultivo a un criovial de 2 ml que contenía un volumen igual de CTS suplementado con glicerol 20% (v/v). Se mezcló y conservó a -70°C [Sambrook, 1989].

II-2-1-2. Extracción de los polisacáridos CP5 y CP8 de *S. aureus*

A partir de las correspondientes cepas productoras de CP5 y CP8 conservadas a -70°C, se procedió a la purificación de los correspondientes polisacáridos capsulares. Se realizaron estrías de cada cepa en agar tripteína soya (ATS) (Britania). Luego de 18 h de crecimiento a 37°C, se repicó una colonia aislada de cada cepa en 3 ml de CTS (Britania), y se cultivaron 18 h a 37°C y con agitación. Un ml de los cultivos anteriores se sembraron en botellas T con ATS suplementado con 2,5% de NaCl, para favorecer la expresión de las cápsulas. A las 18 h, las bacterias crecidas se cosecharon en volumen mínimo de PBS 1x [All] y se procedió a la purificación de los polisacáridos capsulares mediante la técnica de precipitación con etanol, modificada previamente en nuestro laboratorio [Raffaelli, 2009b]. Las células cosechadas se sometieron a agitación magnética durante 1 ½ h y se centrifugaron 4000 rpm, durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron tratados con etanol al 80% (v/v). Luego de 18 h a -20°C se recuperaron los precipitados mediante centrifugación a 4000 rpm, 4°C, 30 min y se lavaron dos veces con volumen mínimo de etanol al 80% (cada lavado fue seguido de un paso de centrifugación para recuperarlos precipitados). Finalmente, los precipitados provenientes del segundo lavado se resuspendieron en volumen mínimo de PBS 1x.

II-2-1-3. Purificación de los polisacáridos CP5 y CP8 de *S. aureus*

Para eliminar proteínas y ácidos teicoicos co-purificados, se realizó una digestión con Proteínasa K, seguida de un tratamiento con peryodato de sodio. Se agregó 0,1 mg/ml de Proteínasa K (BioAmérica) a los productos de la precipitación etanólica y se incubaron 24 h a 37°C. Posteriormente, la enzima se inactivó con calor, incubando 1 h en baño termostático a 80°C. Luego se trató con 10 mg/ml de peryodato de sodio. La reacción transcurrió durante 45 min, en oscuridad y luego se frenó con

etilenglicol al 20%. Los productos provenientes de los tratamientos previos se eliminaron por centrifugación a 10.000 rpm, 4°C, 20 min. Finalmente, los sobrenadantes recuperados, cada uno conteniendo los polisacáridos CP5 y CP8, se dializaron 72 h contra 20 volúmenes de H₂O_d, empleando bolsas de diálisis de 100KDa de corte y realizando recambios de H₂O_d cada 24 h. Para una mejor conservación de los polisacáridos purificados, se liofilizaron los productos de diálisis y se conservaron a -20°C.

II-2-2. Conjugación de CP5 y CP8 de *S. aureus* a ASH, empleando la técnica de la PBQ.

Para la conjugación de los polisacáridos a se utilizó una técnica que emplea *p*-benzoquinona como brazo espaciador entre las moléculas de azúcar y proteína [Tijssen, 1993a]. La proteína transportadora utilizada fue la albúmina sérica humana (ASH). Fue necesario un acondicionamiento de los polisacáridos, previo al desarrollo de la metodología, por lo tanto la estrategia de conjugación se llevó a cabo en 2 etapas. En un primer paso se realizó una de-acetilación de los polisacáridos. Se pesaron 10 mg de cada polisacárido liofilizado, se disolvieron en volumen mínimo de PBS 1x y se agregó NaOH a una concentración final de 0,1 M. Se incubó 18 h, a 37°C en agitación. Las soluciones se neutralizaron con HCl 5M y se dializaron 24 h contra PBS 1x. En una segunda etapa se procedió a la conjugación propiamente dicha, siguiendo la técnica descrita en bibliografía [Tijssen, 1993a]. Se prepararon una solución de 30 mg/ml de PBQ en etanol y una solución de 10 mg/ml de ASH en PBS, pH= 6. Se mezclaron 100 µl de la solución de PBQ con 400 µl de la solución de ASH y se incubaron 1 h a temperatura ambiente, en oscuridad. Se dializó contra PBS 1x empleando tubos de ultrafiltración con membranas de corte de 30 KDa (Vivaspin 20, 30.000 MWCO, Life Sciences, GE Healthcare, Reino Unido) para eliminar el exceso de PBQ. Luego se agregaron 2 mg de CP5 o CP8 de-acetilados, y se llevó el pH= 8. Se agregó bicarbonato de sodio 1M, pH= 8, seguido de una solución 1 M de lisina, pH= 7, ambos en concentración final 0,1 M. Finalmente se dializó contra PBS 1x, en tubos de ultracentrifugación con membranas de corte de 100 KDa (Vivaspin 6, 100.000 MWCO, Life Sciences, GE Healthcare, Reino Unido) para eliminar moléculas proteicas y polisacáridas pequeñas, no conjugadas. Los conjugados obtenidos se denominaron CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}.

Se definen a continuación las denominaciones asignadas a las distintas muestras de polisacáridos:

- CP5 y CP8 nativos: CP5 y CP8 purificados a partir de las cepas específicas. Corresponden a los polisacáridos *O*- y *N*- acetilados, no conjugados a la ASH.
- CP5 y CP8 conjugados: corresponden a CP5 y CP8 de-acetilados y conjugados a la ASH.
- CP5 y CP8 libres: CP5 y CP8 de-acetilados, pero no conjugados a la ASH.

II-2-2-1. Caracterización electroforética (SDS-PAGE) de los conjugados obtenidos

Para comprobar tanto la obtención de los polisacáridos purificados, como de los conjugados, se llevaron a cabo corridas electroforéticas según describe Laemmli [Laemmli, 1970] [AII]. Se emplearon mini-geles de pilacrilamida en una concentración del 12% de Acrilamida/biscacrilamida en el gel de separación, y del 4,8% en el gel de apilamiento. Las muestras se diluyeron al 50% en buffer de siembra 2x [AII], y se hirvieron durante 5 min. Se sembraron 10 μ l de muestra por pocillo del gel y se procedió a la electroforesis en el sistema SE 250 Mini-Vertical unit (Life Sciences, GE healthcare, Reino Unido) a 150 V. Paralelamente a las muestras, se corrieron marcadores de peso molecular de proteínas (SDS-Page Standards Low Range, Thermo Scientific; Page Ruler Prestained, Thermo Scientific). Por cada tipo capsular se sembraron las muestras por cuatuplicado, con el fin de transferir 3 de las réplicas a membranas de nitrocelulosa, y posteriormente realizar una inmunodetección de CP5(8) y ASH.

El revelado de los geles se realizó por inmersión en solución colorante de Coomassie blue durante 30 min, seguidos de dos lavados sucesivos de 1 h en solución decolorante I y solución decolorante II [AII]. Esta coloración permite el revelado de moléculas proteicas. Para la visualización de los polisacáridos se realizó una posterior tinción de los geles con nitrato de plata. Para esto, se llevó a cabo la técnica optimizada descrita por Chevallet [Chevallet y col., 2006] [AII]. Los geles se incubaron en solución de fijación durante 1 h, renovando la solución a los primeros 30 min. Se realizaron dos lavados de 10 min con etanol al 20%, seguido de dos lavados de 10 min con agua destilada (H_2O_d). A continuación se sumergieron los geles 1 min en solución de sensibilización y se volvieron a lavar en H_2O_d durante 1 min. Se colocaron en solución de nitrato de plata durante 45 min, en agitación constante, y se realizó otro lavado de 10 s en H_2O_d . Se incubaron los geles en solución de revelado hasta observar la aparición de bandas y finalmente se lavaron con solución de frenado de la tinción.

II-2-2-2. Inmunodetección de las moléculas conjugadas.

Como se mencionó previamente, 3 de las réplicas electroforéticas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Life Sciences, GE Healthcare), empleando el sistema Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) y solución de transferencia [AII]. La transferencia se dejó transcurrir 40 min, a 100 V y se verificó la técnica coloreando las membranas con una solución de Rojo Ponceau durante 3 min (Sigma).

Para proceder a la inmunodetección, las membranas se decoloraron mediante lavados con PBS 1x. Luego se bloquearon 1 h con PBS- leche, seguido de 3 lavados de 1 min con PBS-Tween [AII].

Para la identificación del componente proteico en los conjugados se utilizó un suero específico preparado en el laboratorio. Se inmunizaron ratones hembras con 2 dosis intraperitoneales a los 0 y 14 días, de 10 μ g/dosis de ASH, formulados con 5 μ g de adyuvante ISCOMATRIX[™] gentilmente cedido por

la empresa ISCONOVA (Suecia). Finalizadas las inmunizaciones, los animales se anestesiaron con 100 μ l de solución de ketamina/xilazina en proporción 2,5 mg: 0,25 mg cada 25 g de peso de animal, y se extrajeron los sueros inmunes por perfusión cardíaca. Finalmente los animales se sacrificaron. Las muestras se incubaron 30 min a 37°C en estufa y se centrifugaron 20 min a 2000 rpm para separar el suero. Los mismos se conservaron a -20°C hasta su utilización en los inmunoensayos. De aquí en adelante, el suero obtenido contra la ASH se denomina anti-ASH.

Para la identificación de los polisacáridos se emplearon sueros de conejo específicos para CP5 ó CP8, preparados durante un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo [Camussone y col., 2012], según protocolos descritos previamente [Karakawa y col., 1985a; Watts y col., 2005]. Por último, se utilizaron sueros de conejo y ratón provenientes de animales control.

Cada réplica de las transferencias se enfrentaron a una dil 1/100 de los sueros de ratón anti-ASH, anti-CP5 o anti-CP8, según corresponda, o al suero control. Luego de 1 h de incubación con los sueros a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados de 1 min con PBS-Tween y se procedió a agregar una dilución 1/5000 del conjugado anti-IgG_{total} de ratón conjugado a HRP-Peroxidasa (Jackson Immunoresearch). Se incubó 1 h a temperatura ambiente, se lavaron las membranas 3 veces con PBS-Tween y finalmente se revelaron con la solución de DAB (Sigma Aldrich) [AII].

II-2-2-3. Espectrofotometría UV-visible

Se adquirieron los espectros UV-Visible (espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 UV/vis) en el rango de longitudes de onda 270-700 nm de las siguientes soluciones: CP5 y CP8 libres, ASH libre, ASH unida a la PBQ (ASH-PBQ, lo cual corresponde al producto de reacción del primer paso de la conjugación) y los conjugados CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}. Cada solución se preparó y midió en buffer PBS 1x, pH= 7, en concentraciones proporcionales a las empleadas en la técnica de conjugación.

II-2-2-4. Determinación de la composición de los conjugados

Se determinaron las concentraciones de cada uno de los componentes de los conjugados. La concentración de ASH se midió empleando la reacción del ácido bicinconínico, según la metodología sugerida por el fabricante (BCA Protein kit assay, Pierce). La cantidad de polisacáridos se determinó por el método del fenol-sulfúrico, siguiendo el protocolo optimizado reportado por Chevallet y col. [Chevallet y col., 2006]. Finalmente, la concentración de PBQ present en el conjugado se midió por espectrometría UV/vis. Para esto, se realizó una curva de PBQ (en buffer PBS 1x, pH= 7) y se midió la absorción de cada punto a 289 nm. Se graficó absorbancia versus concentración y se calculó la regresión lineal de dicha curva. Luego de la diálisis del intermediario de reacción ASH-PBQ, se midió la absorbancia a 289 nm en la fracción eluída y se interpoló dicho valor en la curva de PBQ. La concentración de PBQ en el eluído, corresponde al reactivo no unido a la proteína. Dicho valor se restó a la cantidad inicial de PBQ

usada para la reacción de conjugación, lo cual permitió estimar la cantidad de PBQ unida a la ASH y, por lo tanto, presente en los conjugados. Este proceso se realizó en 5 lotes de conjugación, con el fin de calcular un porcentaje promedio de PBQ unido a la ASH.

II-2-3. Evaluación de la respuesta humoral generada por el conjugado CP5-ASH_{PBQ}

II-2-3-1. Inmunización de ratones y toma de muestras de suero

Para evaluar la inmunogenicidad de los conjugados preparados mediante la técnica de la PBQ, se llevó a cabo un ensayo de inmunización de ratones con el conjugado CP5-ASH_{PBQ}. Tres grupos de ratones CF1, de entre 6 y 8 semanas de edad, se inmunizaron con: el conjugado CP5-ASH_{PBQ}, conteniendo 7,5 µg de CP5; 7,5 µg de CP5 no conjugado; ó PBS 1x (grupo control). Se administraron 4 dosis intraperitoneales, a los 0, 14, 28 y 42 días, formuladas con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) [Tabla 2; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**]. Se tomaron muestras de sangre de la cola de los animales a los días 0, 7, 21, 35 y 49 días iniciado el protocolo de inmunización. Las muestras se incubaron 30 min a 37°C en estufa y se centrifugaron 20 min a 2000 rpm para separar el suero. Los mismos se conservaron a -20°C hasta su utilización en los inmunoensayos. Los animales fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*, y períodos de luz/oscuridad de 12 h durante todo el tiempo experimental.

Tabla 2. Esquema de inmunización y muestreo de ratones.

| Días | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 | 49 | 132 | 134 | 136 | 139 |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|-----------|-----------|
| Dosis/ Desafío | X (1°) | | X (2°) | | X (3°) | | X (4°) | | X (Df) | | | |
| Toma de muestras de suero | X (pl) | X (d1) | | X (d2) | | X (d3) | | X (d4) | X (Df) | X (2-PDf) | X (4-PDf) | X (7-PDf) |

1°-4°, denotan las dosis administradas. Df, representa el desafío. Las muestras de sueros se denominaron de la siguiente manera: pl, pre-inmune. d1-d4, muestras tomadas 7 días después de la 1°- 4° dosis, respectivamente. Df, muestra tomada antes del desafío. 2/4/7-PDf, muestras tomadas a los 2, 4 y 7 días post-desafío.

II-2-3-2. Desafío de los animales con CP5 nativo.

A fin de evaluar si el conjugado CP5-ASH_{PBQ} era capaz de generar memoria inmunológica, al día 132 (a 90 días de la última dosis) todos los grupos fueron desafiados con 7,5 µg de CP5 nativo (acetilado y no conjugado,). Se tomaron muestras de sangre de la cola a los días 132 (antes del desafío), 134 y 136 [Tabla 2]. Al día 139 se tomaron muestras sangre por perfusión cardíaca [II-3-2-1].

II-2-3-3. Cinética de la respuesta de IgG_{total} e IgM.

Con los sueros de los animales tomados a distintos tiempos se realizaron ensayos de ELISA indirectos para observar la cinética de producción de IgG e IgM en cada grupo. Se realizó el ensayo siguiendo el protocolo detallado en el apartado II-3-2-3. Para estos ensayos se sensibilizaron las placas con CP5 libre, no conjugado (5 µg por pocillo). Se trabajó con 100 µl de diluciones 1/200 de los sueros. Se emplearon anticuerpos secundarios anti-IgG_{total} de ratón (Jackson ImmunoResearch) y anti-IgM de ratón (Sigma-Aldrich), ambos conjugados a HRP-Peroxidasa y en dilución 1/5000.

II-2-3-4. Determinación de los títulos de IgG_{total} por ELISA.

Se realizó un ensayo de ELISA indirecto en placas de 96 pocillos de fondo plano (GBO) para determinar los títulos de IgG_{total} en las muestras de suero correspondientes a los 49, 139 y 148 días del protocolo de inmunización. Se sensibilizaron las placas con 0,5 µg de ASH en buffer carbonato [AII] ó 5 µg de CP en PBS, incubando durante 2 h a 37°C. Se realizaron 3 lavados de 1 min con PBS-Tween y se bloquearon los pocillos incubando 1 h a 37°C con 200 µl de PBS-leche descremada 5x. Posteriormente se agregaron diluciones seriadas al ½ de los sueros, y se llevaron a estufa 1 h, 37°C. Luego de otros 3 lavados de 1 min con PBS-Tween, se incubaron las placas 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario anti-IgG_{total} de ratón conjugado a HRP-Peroxidasa (Jackson ImmunoResearch). Finalmente se efectuaron 3 lavados más de 1 min con PBS-Tween y se procedió al revelado de las placas mediante el agregado de una gota de TMB (Invitrogen). La reacción se frenó con una gota por pocillo de H₂SO₄ 0,5 N y se leyeron las D.Os a 450 nm en un lector de microplacas (Biotek®, Elx808).

Se emplearon diluciones seriadas al medio de los sueros desde 1/200. Los títulos de anticuerpos se definieron como la mayor dilución a la cual la D.O era mayor a la de la dilución 1/200 de los sueros control.

II-2-3-5. Determinación de isotipos IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b}.

Se realizaron Elisas indirectos para determinar IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ en las muestras de sueros de los animales inmunizados con el conjugado CP5-ASH_{PBO}, extraídas a los 49 días. Se sensibilizaron las placas con 5 µg de CP5 y se procedió al ensayo de ELISA empleando el sistema comercial Mouse Typer® Sub-isotyping Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad).

II-2-3-6. Análisis estadísticos

Para analizar las cinéticas de producción de anticuerpos se determinó, para cada animal, el área bajo la curva entre los días 0 y 49 correspondientes al protocolo de inmunización y se compararon dichas áreas con el test One-way ANOVA-Kruskall-Wallis, seguido del post test de Dunn para comparaciones

múltiples. La significancia estadística del incremento de IgG luego de la aplicación de cada dosis, se determinó empleando el test estadístico ANOVA-Friedman, seguido del post test Dunn. Las subclases de IgG también se compararon usando One-way ANOVA-Kruskall-Wallis y el post test de Dunn. En todos los casos se empleó el programa estadístico MedCalc 12.7.5 para Windows.

II-3. RESULTADOS

II-3-1. Obtención de los polisacáridos CP5 y CP8 de *S. aureus*

A partir de cepas de *S. aureus* de referencia productoras de CP5 y CP8, se purificaron dichos CPs mediante un protocolo de precipitación con etanol puesto a punto previamente en nuestro laboratorio para el desarrollo de conjugados CP8-proteína mediante otras técnicas de conjugación [Pujato, 2009; Raffaelli, 2009a]. Los extractos de CPs obtenidos mediante dicha técnica se muestran en las figuras 6 y 7 (calles 3 y 4, respectivamente). En las imágenes correspondientes a la tinción argéntica, puede observarse una distribución de moléculas de polisacárido de tamaños heterógenos a lo largo de la calle del gel, siendo mayoritario los productos desde aproximadamente 25 KDa hasta altos PM superiores a 116 KDa (tamaño máximo del marcador de peso molecular empleado). La tinción con Coomassie Blue, no reveló bandas en las calles correspondientes a CP5 y CP8. Esto sugiere que no hay impurezas proteicas en los extractos o que se encuentran por debajo del límite de detección de la coloración (límite de detección del Coomassie blue G-250: 10-50 ng).

II-3-2. Conjugación de CP5 y CP8 de *S. aureus* a ASH empleando la técnica de la PBQ.

II-3-2-1. Caracterización electroforética (SDS-PAGE)

Los polisacáridos CP5 y CP8 obtenidos se conjugaron a ASH mediante la técnica de la PBQ. Para verificar el éxito de la conjugación se llevó a cabo un SDS-PAGE y ensayos de Westernblot, donde se corrieron una solución de ASH, una solución de CP5 ó CP8 y los productos de conjugación CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}. Los geles se revelaron por tinción con Coomassie blue para observar los productos proteicos, seguido de una tinción argéntica para revelar polisacáridos [Figuras 6 y 7]. El análisis simultáneo de ambas tinciones, permite ver que a pesar de que el patrón de los conjugados es el mismo que el de los CPs [Figura 6, calle 2; Figura 7, calle 3], los primeros pueden visualizarse con la coloración con Coomassie blue, a diferencia de los CPs no conjugados que son revelados luego de una segunda tinción con plata. Esto sugiere una asociación entre la proteína transportadora y las moléculas de diferentes tamaños de los polisacáridos. Cabe destacar que no se detectan bandas de ASH remanente de la reacción en la calle del conjugado, indicando que la metodología de la PBQ permitió la conjugación de toda la proteína usada en la reacción.

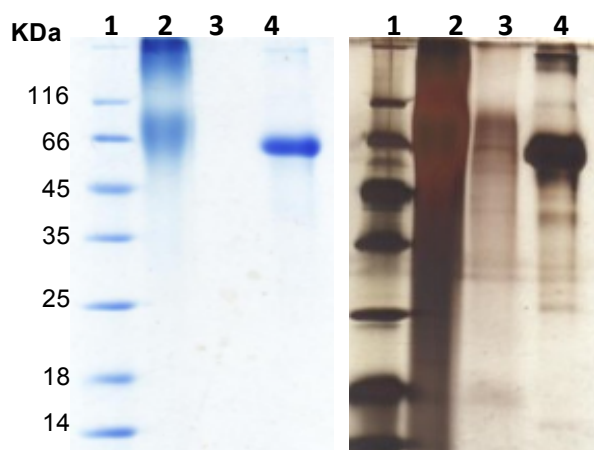


Figura 1. Caracterización electroforética del conjugado CP5-ASH_{PBQ}. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15%. Izq: Tinción con Coomassie blue. Der: Tinción con nitrato de plata. Calle 1: MPM, calle 2: CP5-ASH_{PBQ}, calle 3: CP5, calle 4: ASH.

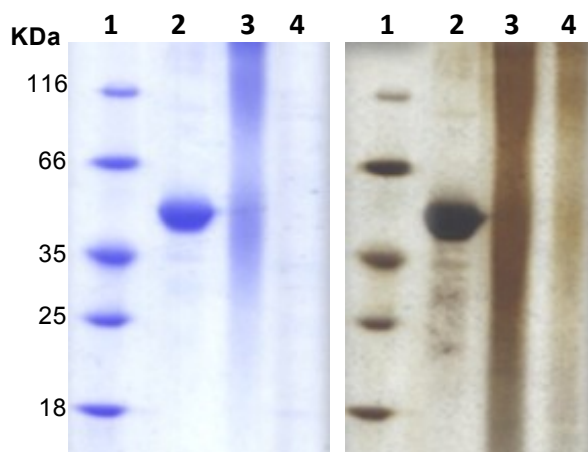


Figura 2. Caracterización electroforética del conjugado CP8-ASH_{PBQ}. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%. Izq: Tinción con Coomassie blue. Der: Tinción con nitrato de plata. Calle 1: MPM, calle 2: ASH, calle 3: CP8-ASH_{PBQ}, calle 4: CP8.

II-3-2-2. Inmunodetección de las moléculas conjugadas

Para corroborar la identidad de los conjugados y analizar la presencia de componentes libres (no conjugados) se realizaron ensayos de Western blot [Figura 8 y 9]. Para la identificación de CP5 y CP8 en los conjugados, se emplearon sueros de conejo específicos anti-CP5 y anti-CP8 (membranas A y B, respectivamente), mientras que las membranas C y D se enfrentaron a un suero de ratón anti-ASH. Los sueros reconocieron sus correspondientes moléculas blanco dando idéntico patrón de revelado, y por ende, sugiere que los CPs se unieron efectivamente a la proteína, sustentando lo observado en los geles de poliacrilamida. Además, confirma que la reacción de conjugación fue altamente eficiente, ya que no quedaron cantidades detectables de proteína sin conjugar.

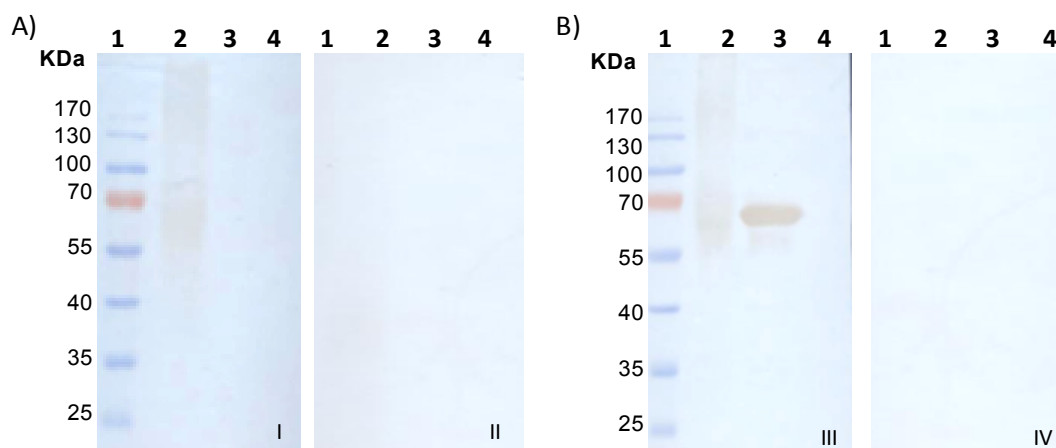


Figura 8. Caracterización del conjugado CP5-ASH_{PBQ} por Western blot. Las membranas se enfrentaron a A.I) suero de conejo anti-CP5. A.II) suero normal de conejo. B.III) suero de ratón anti-ASH. B.IV) suero normal de ratón. Calle 1: MPM, calle 2: CP5-ASH_{PBQ}, calle 3: ASH, calle 4: CP5.

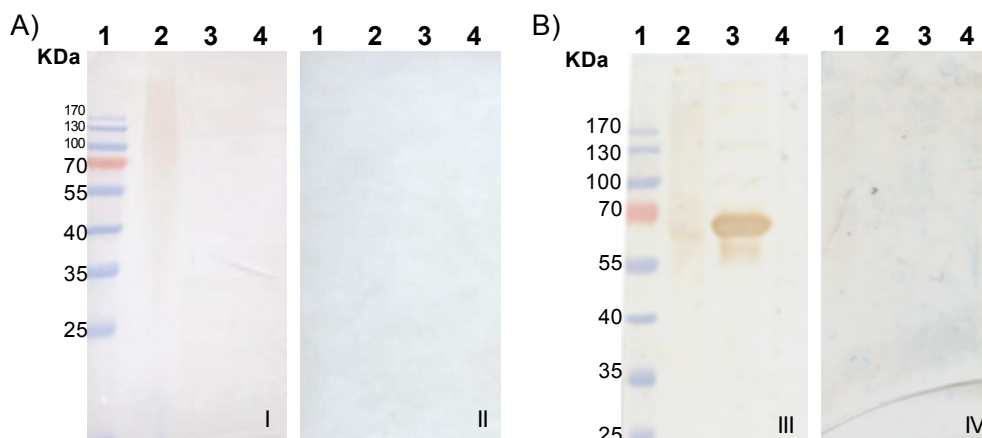


Figura 9. Caracterización del conjugado CP8-ASH_{PBQ} por Western blot. Las membranas se enfrentaron a A.I) suero de conejo anti-CP8. A.II) suero normal de conejo. B.III) suero de ratón anti-ASH. B.IV) suero normal de ratón. Calle 1: MPM, calle 2: CP8-ASH_{PBQ}, calle 3: ASH, calle 4: CP8.

II-3-2-3. Espectrometría UV-Vis

De la caracterización de los conjugados mediante espectrometría Uv/vis se obtuvieron diferentes espectros de absorción para cada solución evaluada (Figura 10), que permitieron confirmar la unión de los polisacáridos a la ASH y, por lo tanto, la formación de los conjugados. La ASH dió absorción a 280 nm, característico de las proteínas. El espectro de la solución de PBQ mostró un máximo de absorbancia a 289 nm, y una banda amplia pero débil entre 360- 600nm, correspondientes a componentes hidroquinonas e hidroxiquinonas. En el caso de las soluciones de CP5 y CP8 no se pudo detectar un pico claro de absorción en el rango de longitudes de onda empleados. Al analizar los espectros del intermediario ASH-PBQ y de los conjugados, se observa un nuevo pico de absorción a 350 nm, lo cual sugiere la formación de un nuevo compuesto cromóforo.

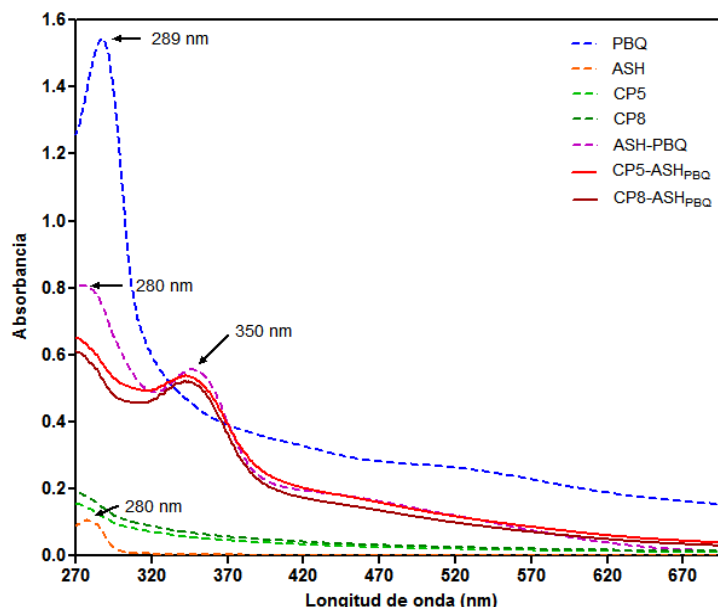


Figura 10. Caracterización de los conjugados por espectrometría UV/visible. Se adquirieron los espectros de absorción entre 270- 700 nm de distintas soluciones correspondientes a los componentes iniciales de reacción, intermediarios y los conjugados finales. Se indican los picos importantes de absorción para cada solución evaluada.

II-3-2-4. Determinación de la composición de los conjugados

Se determinó la composición de los conjugados en cuanto a concentración de azúcares totales, azúcares libres, proteínas y PBQ. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. A partir de las cuantificaciones de cada uno de los componentes de los conjugados, se calculó la relación relativa al peso ASH: PBQ: CP5, la cual resultó similar en ambos conjugados.

Tabla 3. Composición de los conjugados CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}

| | CP (mg/ml) | Proteína (mg/ml) | PBQ (mg/ml) | Proporción ASH:PBQ:CP | % CP libre |
|------------------------|---------------|---------------------|----------------|--------------------------|------------|
| CP5-ASH _{PBQ} | 3,60 | 7,40 | 3,30 | 2: 0,9: 1 | 7,22 |
| CP8-ASH _{PBQ} | 2,53 | 4,89 | 1,71 | 2: 0,7: 1 | 20,93 |

II-3-3. Evaluación de la respuesta humoral generada por el conjugado CP5-ASH_{PBQ}

II-3-3-1. Análisis de las cinéticas de IgG_{total} e IgM

Para evaluar la respuesta humoral generada por el conjugado CP5-ASH_{PBQ}, se determinaron los niveles de IgG_{total} e IgM mediante ensayos de ELISA, en todas las muestras de sangre tomadas a lo largo del

ensayo. Con los valores obtenidos se graficaron las curvas de producción de anticuerpos y se determinaron las áreas bajo las curvas para comparar las respuestas humorales globales generadas por los distintos grupos inmunizados (CP5-ASH_{PBQ} o CP5 libre). Dichos resultados se muestran en la figura 11 y en la tabla 4.

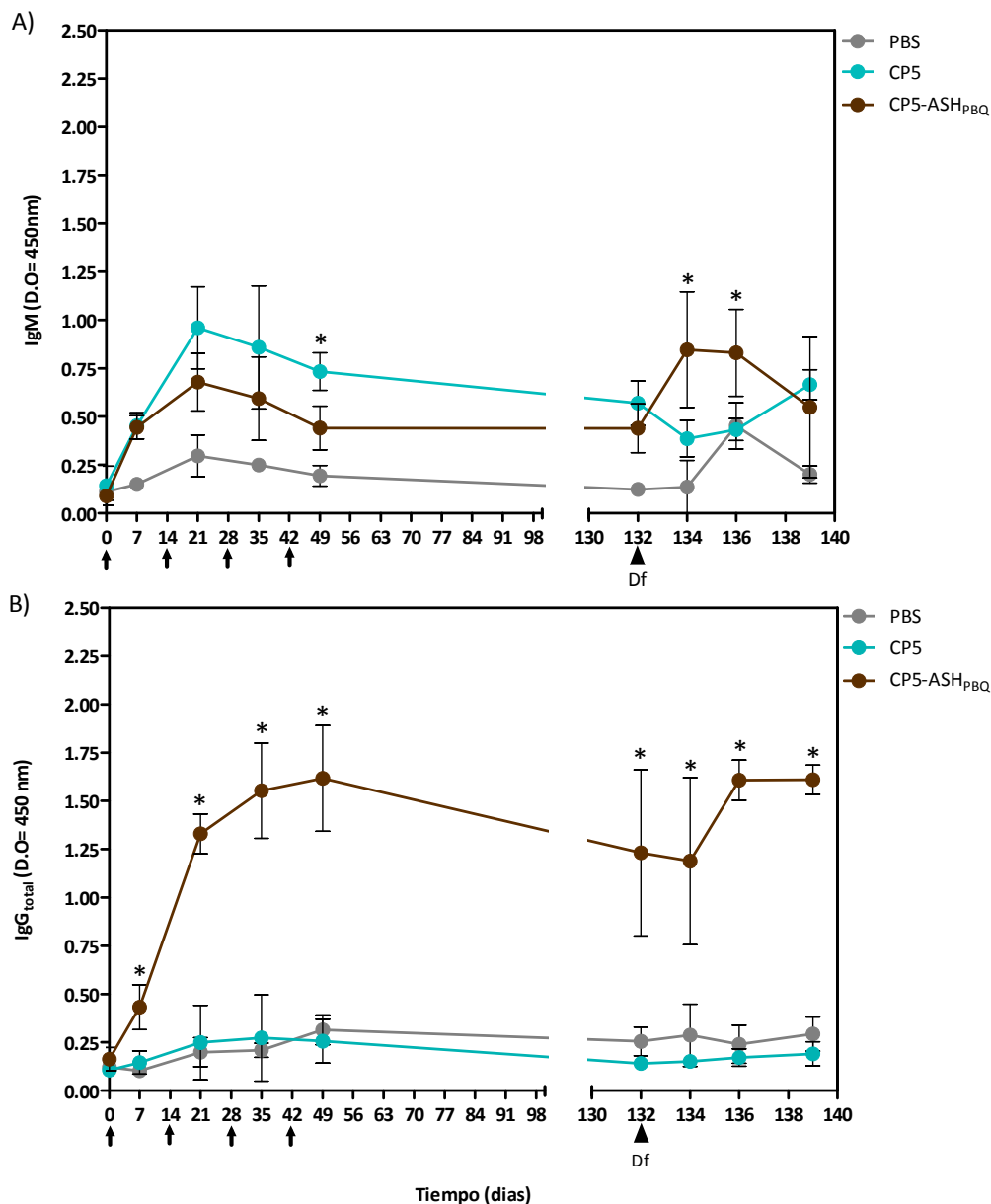


Figura 11. Cinética de producción de anticuerpos IgG_{total} e IgM. Se inmunizaron ratones con 4 dosis (las flechas indican 1°, 2°, 3° y 4°) de CP5-ASH_{PBQ}, CP5 libre ó PBS, y al día 132 se desafiaron con CP5 nativo (Df). Se determinaron los niveles IgM (A) e IgG_{total} (B) por ELISA, en muestras de suero tomadas a lo largo del esquema experimental. Se muestra la media ± DE (barras). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo CP5 o CP5-ASH_{PBQ}, según corresponda (ANOVA-Kruskall-Wallis, p < 0,01).

Tabla 4. Área bajo las curvas correspondientes a las cinéticas de producción de IgM e IgG_{total}

| Grupo | Area bajo la curva de IgM | DE | Area bajo la curva de IgG | DE |
|------------------------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|
| PBS | 9,324 | 3,609 | 8,071 | 2,142 |
| CP5 | 35,86 ^a | 6,898 | 11,03 | 3,898 |
| CP5-ASH _{PBQ} | 25,89 | 4,428 | 56,82 ^a | 4,261 |

^a Diferencias significativas respecto de los otros grupos (ANOVA-Kruskal-Wallis, $p < 0,01$; Dunn $p < 0,05$).

Ambos inmunógenos fueron capaces de inducir la producción de IgM específica, aunque sólo el CP5 indujo niveles significativos respecto del grupo control (ANOVA-Kruskal-Wallis, $p < 0.01$; Dunn's $p < 0.05$). Sin embargo, al analizar las cinéticas de IgG_{total}, se puede ver que el CP5 no produce este isotipo de inmunoglobulina, dando el mismo comportamiento que el grupo control. En cambio, la inoculación del conjugado dio una alta respuesta de IgG_{total}, difiriendo significativamente del grupo control y del grupo CP5 (ANOVA-Kruskal-Wallis $p < 0.01$, Dunn's $p < 0.05$).

Además se realizó una comparación de las D.O alcanzadas luego de cada dosis de CP5-ASH_{PBQ}, con el fin de determinar la mínima cantidad de dosis necesarias para producir el máximo nivel de anticuerpos [Figura 12]. La meseta en la producción de IgG_{total} se obtuvo luego de la 3° dosis (d3), ya que la 4° dosis (d4) no produjo un aumento significativo de anticuerpos ($p > 0,05$). Sin embargo, cabe destacar que 2 dosis de conjugado son suficientes para alcanzar el 80% del valor máximo de IgG_{total}. El título de IgG_{total} obtenido con 3 dosis fue 1/238.900 [Figura 13].

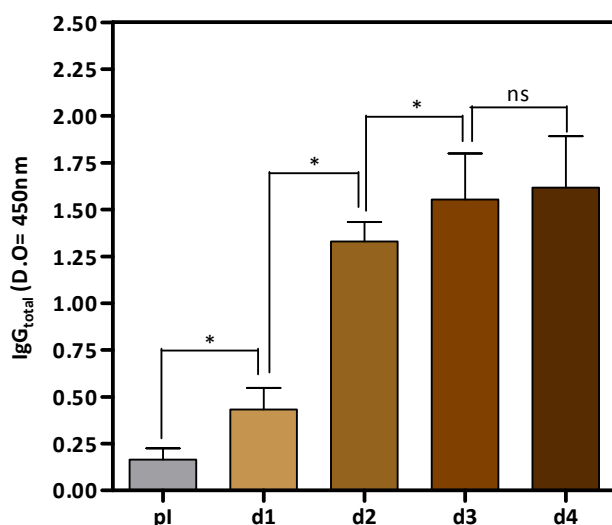


Figura 3. Análisis de las dosis de CP5-ASH_{PBQ}. Se representan los valores provenientes de la cinética de IgG como gráfico de barras. Se muestra la media \pm DE (barras). pl: pre-inmune, d1-d4: 7 días luego de las dosis 1-4, respectivamente. *Diferencias significativas entre las dosis, Friedman, $F = 74.0278$, $p < 0.001$; Dunn's, $p < 0.05$.

II-3-3-2. Evaluación de la respuesta humoral de memoria

Con el objetivo de estudiar si la inmunización con el conjugado es capaz de generar linfocitos B de memoria, luego de 3 meses de la última dosis se desafiaron todos los grupos con CP5 libre, y nuevamente se compararon las respuestas de IgM e IgG_{total} específicas durante la primera semana post-desafío (PDf) [Figura 11]. De la misma manera que durante el protocolo de inmunización, el desafío del grupo CP5, dio sólo una respuesta de IgM que resultó significativa respecto del control al día 7-PDf (ANOVA-Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Así, los resultados muestran que el polisacárido por sí solo no genera memoria inmunológica, mientras que en el grupo inmunizado con el conjugado se observó un rápido incremento en los niveles de ambas inmunoglobulinas (ANOVA-Kruskal-Wallis, $p < 0,05$, respecto del grupo PBS).

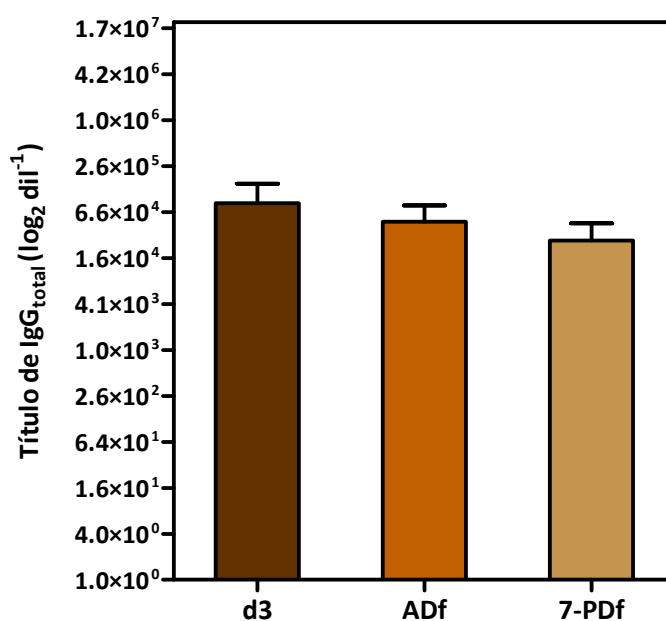


Figura 13. Análisis de la respuesta humoral generada por el CP5-ASH_{PbQ} a largo plazo. Se determinaron por ELISA los títulos de IgG_{total}, en muestras de suero tomadas en el grupo CP5-ASH_{PbQ} a los siguientes tiempos: d3, 7 días de la 3^o dosis. ADf, antes del desafío. 7-PDf, 7 días post-desafío. Se muestran los títulos de cada animal y la media \pm DE (barras) en cada tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre los tres puntos de tiempo.

Para un mejor análisis y comparación de la respuesta humoral generada por el conjugado a largo plazo, se determinaron los títulos de IgG_{total} en los días d3, ADf y 7-PDf. A pesar de que en la figura 11 se observa una disminución en las D.O en el día del desafío (Df), respecto de d4 al finalizar la inmunización, la comparación de los títulos de IgG en ambos tiempos no presentó diferencias significativas [Figura 13]. Tampoco se detectaron diferencias respecto de los títulos obtenidos al final del protocolo experimental (7-PDf). Este mantenimiento de los niveles de anticuerpos a largo plazo, indica el desarrollo de una respuesta T-dependiente de memoria inducida por el CP5-ASH_{PbQ}.

II-3-3-3. Subclases de IgG

Para evaluar el perfil de respuesta humoral que genera el conjugado, se determinaron las subclases de IgG en las muestras d3 del grupo inmunizado con el CP5-ASH_{PBQ}. Se obtuvieron niveles equivalentes de IgG₁, IgG_{2b} e IgG₃, mientras que la IgG_{2a} fue el subtipo prevalente ($p < 0.05$) [Figura 14].

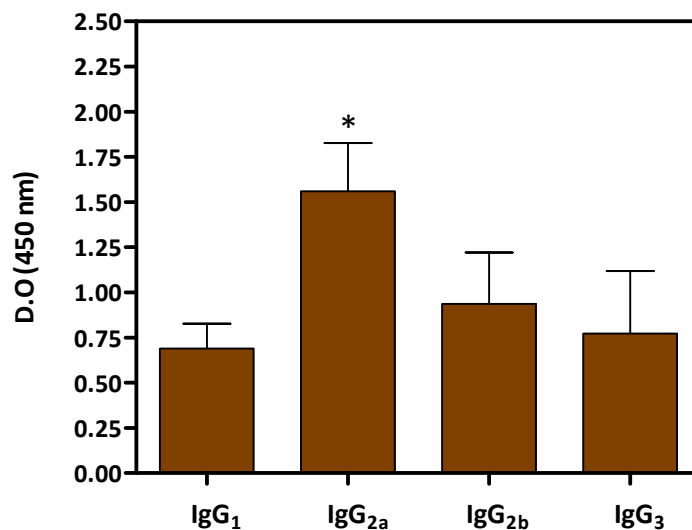


Figura 14. Subclases de IgG en las muestras de suero tomadas al día 35. Mediante ensayos de ELISA se determinaron los niveles de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ en muestras de suero provenientes del grupo inmunizado con CP5-ASH_{PBQ}, tomadas al día 35. Las barras muestran los valores máximos y mínimos, y la línea en el interior de las cajas representa la mediana. *Diferencias significativa respecto de los demás grupos (ANOVA-Kruskal-Wallis, $p < 0.01$; Dunn $p < 0.05$).

II-4. DISCUSIÓN

El rol de los polisacáridos capsulares en la virulencia de *S. aureus* los ha convertido desde épocas tempranas, en blancos de interés para el desarrollo de vacunas contra la mastitis causada por dicha bacteria. La utilización de estos componentes en la formulación de vacunas cuenta con la dificultad ser antígenos T-independientes. Por lo tanto, para generar una respuesta humoral efectiva y a largo plazo, dichas moléculas deben conjugarse a proteínas transportadoras. Por lo tanto el trabajo fue dirigido a obtener una metodología de conjugación que permita, en el futuro, escalar la producción de una vacuna de bajo costo basada en polisacáridos. Para ese fin se decidió evaluar el desempeño de la técnica de la PBQ, que ha sido empleada para el acoplamiento de enzimas a anticuerpos u otras proteínas destinadas a diagnóstico, inmunohistoquímica y demás inmunoensayos *in vitro* [Ternyck y Avrameas, 1976; Tijssen, 1993b]. El procedimiento está descrito también para la conjugación de polisacáridos [Brandt y col., 1975; Kozel y Hermerath, 1984; Tijssen, 1993a], pero no se han encontrado antecedentes respecto a su aplicación para la preparación de inmunógenos.

Del análisis del mecanismo de reacción [Figura 5], se puede observar que son los grupos amino y/o hidroxilos del polisacárido los que reaccionan con la PBQ. Debido a que los CPs de *S. aureus* están N-acetilados y O-acetilados [Figura 4], y el grado de acetilación varía entre diferentes cepas, se decidió realizar una derivatización de los CPs previa a la reacción de conjugación. De esta manera, se aseguraría la disponibilidad de la mayor cantidad posible de grupos amino e hidroxilos para reaccionar y un mejor rendimiento de la conjugación. El razonamiento empleado para corroborar el éxito de la conjugación, fue: 1) que los polisacáridos no se tiñen con Coomassie blue y 2) que los CPs no se unen a las membranas de nitrocelulosa. Esta última característica, se ha observado en distintos trabajos llevados a cabo en el laboratorio y fue finalmente confirmada mediante ensayos de Dot blot y ELISA, que permitieron descartar problemas en la transferencia [AI-2-1]. Por un lado, el análisis en SDS-PAGE mostró que el CP5-ASH_{PBQ} obtenido da un patrón electroforético similar al del CP5 libre, pero de mayor peso molecular, y observable con la tinción con Coomassie. Esto sugiere que hay una asociación entre la proteína y el polisacárido. Al mismo tiempo, el ensayo de Western blot confirmó la presencia de ambos componentes a lo largo de toda la corrida electroforética. Ambos resultados combinados indican que el CP5 está acoplado a la ASH, constituyendo el conjugado y comprobando la eficacia de la técnica usada. Cabe destacar que el método resultó fácil de desarrollar y permitió la conjugación de toda la proteína agregada a la mezcla de reacción, lo cual facilita los posteriores pasos de purificación y, en consecuencia, el escalamiento. El CP5-ASH_{PBQ} se obtuvo con una proporción CP/proteína de 0,5. Este valor se encuentra dentro del rango 0,5- 1 reportado en bibliografía por otros autores y utilizado en vacunas aprobadas [Brandt y col., 1975; Borrow y col., 2013].

Es importante remarcar que no se observaron efectos tóxicos en los ratones inoculados con el conjugado. Por un lado, luego de la reacción química de conjugación, la PBQ es oxidada para dar una hidroquinona en el producto final de conjugación. La FDA (del inglés "Food and Drug Administration") clasifica a la hidroquinona como un producto seguro, ya que los experimentos llevados a cabo en ratas y ratones muestran la aparición de efectos tóxicos solo a muy altas concentraciones, que van entre los 50-300 mg/Kg/día [FDA, 2006]. En el presente trabajo, los ratones fueron inmunizados con 7 µg de CP5. Considerando la relación PBQ: CP= 0,9: 1 [Tabla 3], la dosis de PBQ administrada (ó de hidroquinona derivatizada) fue de 6,3 µg. Considerando un peso promedio de los ratones de 20 g, la cantidad inoculada resultó de 0,32 mg/Kg/ dosis. Por otro lado, los restos de PBQ sin reaccionar son eliminados tras el paso de diálisis. Sin embargo, el hecho de que queden trazas de PBQ en la muestra final de conjugado, no parece tener un riesgo significativo. La Agencia de Protección Ambiental y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (EPA, del inglés "Environmental Protection Agency" e IARC, del inglés "International Agency for Research on Cancer", respectivamente) no han clasificado a la PBQ como cancerígena [IARC, 1977; EPA, 1999]. Se sabe que la exposición por inhalación o contacto directo a altas concentraciones del reactivo puede resultar en irritación de los ojos, disturbios visuales y dermatitis [Sittig, 1985; DHHS, 1993], pero no hay datos disponibles acerca de las concentraciones o dosis de referencia [EPA, 1999].

Las respuestas inmunes obtenidas contra el CP5-ASH_{PBQ} y el CP5 libre representan los eventos característicos de las respuestas a antígenos T-dependiente y T-independiente, respectivamente. El isotipo IgM es producido durante el desarrollo de la respuesta primaria frente a ambos tipos de antígenos, pero en el caso de los T-dependiente, ocurre el cambio de isotipo a anticuerpos IgG. En nuestro ensayo, se obtuvieron respuestas de IgM específica en ambos grupos inmunizados con el conjugado y el polisacárido libre, pero sólo en el primero se observó el cambio a IgG. Este fenómeno se aprecia al comparar simultáneamente las cinéticas de ambos anticuerpos, donde se ve que la disminución en los niveles de IgM, está acompañada del aumento de IgG. Cada dosis refuerzo administrada produjo un incremento de los niveles de IgG, el cual se vio acompañado de una disminución en la IgM, indicando el desarrollo de una respuesta secundaria también característica frente a antígenos T-dependiente. A pesar de que los polisacáridos pueden generar la producción de bajos niveles de IgG de baja afinidad [Mond y col., 1995; Garcia de Vinuesa y col., 1999], en el grupo CP5 libre, no se detectó este isotipo. Trabajos previos reportaron idénticos resultados para los CP5 y CP8 a los descritos en esta tesis [Beuvery y col., 1982; Fattom y col., 1993]. La máxima respuesta de IgG inducida por el conjugado se alcanzó con sólo 3 dosis, lo cual tiene importancia a los fines prácticos que apuntan a obtener una respuesta óptima con la aplicación de una mínima cantidad de dosis. Sin embargo, la dosis adecuada deberá optimizarse en la especie bovina, a la cual estará destinada la vacuna prototípica formulada con los conjugados obtenidos en el presente trabajo.

Otra característica de la respuesta inmune que interesaba evaluar era la generación de memoria inmunológica al inmunizar con el conjugado. Dado que durante una infección natural el CP del microorganismo no se encuentra conjugado, se realizó un desafío con el CP5 libre y se analizó la respuesta inmune inducida contra el CP nativo. Se decidió usar CP nativo en vez de usar bacterias enteras para poder conocer la concentración de CP con la que se realizó el desafío. En concordancia con el diseño experimental, las normativas que regulan las evaluaciones necesarias para el desarrollo de vacunas conjugadas comerciales, prevén el uso de CP en vez de bacteria entera en los ensayos de eficacia [Borrow y col., 2013]. Los resultados del desafío mostraron que los animales que habían sido inmunizados con el CP5-HSA_{PBQ}, en contraposición a los inmunizados con CP o controles no inmunizados, respondieron rápidamente al antígeno. Esto indica que el conjugado fue capaz de generar una respuesta humoral de memoria.

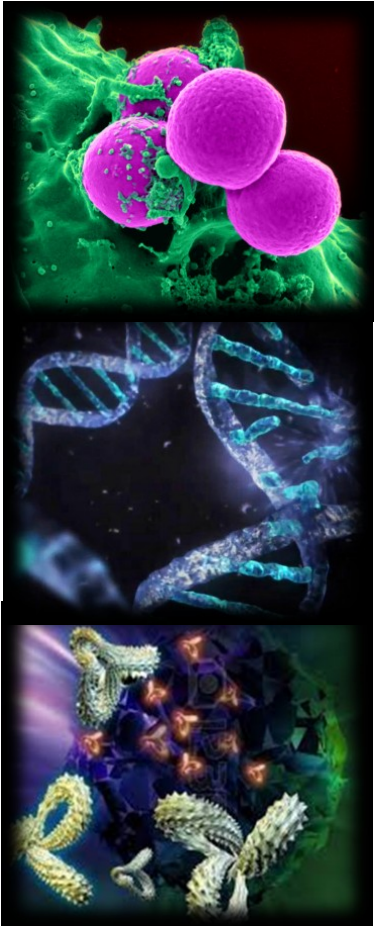
Se debe tener en cuenta que en la metodología empleada, para llevar a cabo la reacción de conjugación el polisacárido necesita de-acetilarse para dejar libre los grupos hidroxilos involucrados en la unión a la PBQ. A pesar de esta modificación química, los inmunoensayos realizados a lo largo del trabajo demostraron que no se produjeron alteraciones en cuanto a las propiedades inmunológicas del CP, ya que los sueros generados contra CP nativo eran capaces de reconocer al conjugado y viceversa. Inclusive, tras el desafío de los animales se observó un incremento en los niveles de IgG, indicando que las células B de memoria generadas contra el CP5 de-acetilado y conjugado, son reconocidas y activadas por el CP5 nativo. Algunos autores también concluyeron que la de-acetilación no afecta la inmunogenicidad de los polisacáridos, e incluso puede aumentar la respuesta inmune inducida [Fattom y col., 1998; Maira-Litran y col., 2005]. Refuerza este concepto la existencia de una vacuna conjugada disponible comercialmente, compuesta por el PS tipo 3 de-acetilado de *Meningococcus C* [Borrow y col., 2013].

Finalmente, para caracterizar el perfil inmunológico, se determinaron las subclases de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃, luego de la 3° dosis, en los animales inoculados con el conjugado. Para realizar este análisis se utilizó un kit comercial que ya se encuentra optimizado para detectar cantidades equivalentes de cada subclase, lo que permitió que las densidades ópticas obtenidas con los anticuerpos específicos para cada subclase pudieran ser comparadas. La administración del CP5-ASH_{PBQ} genera la producción de todas las subclases, aunque se obtuvieron mayores niveles para IgG_{2a}. Se describió que este último subtipo es más protectoro contra bacterias encapsuladas [Bondada y col., 2000], ya que une el complemento con alta afinidad, aumenta la fagocitosis y promueve la citotoxicidad dependiente de anticuerpos [Nimmerjahn y Ravetch, 2005]. Particularmente, para el caso de *S. aureus*, se determinó que las subclases de ratón IgG_{2a} e IgG_{2b} son necesarias para la eficiente opsonización de la bacteria [Fattom y col., 1995b]. Si se analiza la relación IgG_{2a}/IgG₁, la cual resulta mayor a 1, puede inferirse un importante perfil de respuesta

celular [Mosmann y Coffman, 1989]. Dado que *S. aureus* tiene la capacidad de invadir células y manifestarse como patógeno intracelular [Lee y col., 2005], dicho perfil de respuesta podría aportar un componente adicional para lograr una inmunidad protectora. Respecto a la subclase IgG₃, se ha descrito que juega un rol en la protección contra bacterias que expresan CPs [Nimmerjahn y Ravetch, 2005]. Si bien este anticuerpo se expresa normalmente en una proporción muy baja respecto de las demás subclases, la inmunización con el conjugado logró estimular la producción de IgG₃ en niveles equivalentes a la IgG₁ e IgG_{2b}. Deberá posteriormente evaluarse la producción homogénea de las diferentes subclases de IgG en el modelo bovino, destinatario de la vacuna en desarrollo.

II-5. Conclusiones parciales

- La técnica de conjugación que emplea *p*-benzoquinona constituye una alternativa prometedora para el desarrollo de vacunas basadas en componentes polisacáridos, considerando que es una técnica sencilla de realizar, reproducible, de bajo costo y de alto rendimiento que permitió potenciar las propiedades inmunogénicas de los polisacáridos conjugados.
- CP5-ASH_{PBQ} una buena respuesta de IgG_{total} en ratones, alcanzando títulos de anticuerpos específicos contra CP5 (superiores a los descritos en trabajos previos) y estimulando la producción de todas las subclases de IgG (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃), cada una con un rol importante para la protección contra cepas encapsuladas de *S. aureus*.
- El conjugado CP5-ASH_{PBQ} fue capaz de generar memoria inmune contra el polisacárido, dado que generó una respuesta humoral de larga duración y los animales inmunizados respondieron adecuadamente al desafío con el CP nativo realizado a los 3 meses de la última dosis administrada.
- La relación de subclases IgG_{2a}/IgG₁ obtenida denota un perfil de respuesta inmune celular, que conferiría protección contra las infecciones intracelulares de *S. aureus*.
- Los conjugados CP5(8)-ASH, obtenidos mediante la técnica de la PBQ, constituyen candidatos prometedores para el desarrollo de vacunas contra las infecciones causadas por *S. aureus*.



Capítulo III

Producción de proteínas bacterianas recombinantes: rFnBP, rClf, rAtox, rBtox y rlsdH

III-1. INTRODUCCIÓN

III-1-1. Proteínas de adhesión de *S. aureus*

Luego de ingresar a la glándula mamaria, a través del canal del pezón, y de adaptarse al entorno de la glándula, *S. aureus* tiene la capacidad de replicarse rápidamente y expresar las proteínas de adhesión que le permiten fijarse al tejido mamario. Este proceso facilita la invasión celular, lo cual contribuye a la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador, persistencia en el hospedador y colonización de los tejidos vecinos [Joh y col., 1999].

Las proteínas de adhesión bacteriana, llamadas colectivamente MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), son proteínas de la superficie de las bacterias gram positivas, capaces de unirse específicamente a moléculas de la matriz extracelular del hospedador, como colágeno, fibrinógeno y fibronectina [Fowler y col., 2000]. Las MSCRAMMs presentan características estructurales comunes. Hacia el extremo N-terminal tienen una secuencia señal secretoria (S) y un dominio de unión al ligando que se expone sobre la superficie celular permitiendo que estas proteínas funcionen como adhesinas [Sordillo y col., 1987; Rainard y Riollet, 2006]. En el extremo C-terminal poseen una región de anclaje a la pared celular (PC) y un dominio hidrofóbico transmembrana (M), una región rica en aminoácidos cargados positivamente (RR) que se extiende hacia el interior del citoplasma de la célula bacteriana y el dominio de reconocimiento para sortasa (LPXTG) [García, 2004; Rainard y Riollet, 2006].

La habilidad de los patógenos de adherirse a los tejidos del hospedador es un primer paso esencial para la colonización y el establecimiento de la infección [Brouillette y col., 2003b; Kalorey y col., 2007]. Dado este rol fundamental en el proceso infeccioso, las proteínas de adhesión constituyen un blanco importante para el desarrollo de agentes antimicrobianos. Las adhesinas de *S. aureus*, dado que tienen afinidades por distintos ligandos, se expresan de manera diferencial durante las infecciones naturales, dependiendo del tejido en que se encuentre el organismo o el medio de cultivo empleado. En el caso de la mastitis bovina, se ha demostrado que la FnBP A y Clf A tendrían un papel fundamental en la adherencia e invasión de la glándula mamaria [Dziewanowska y col., 1999; Hensen y col., 2000; Brouillette y col., 2002; Brouillette y col., 2003a; Shkreta y col., 2004].

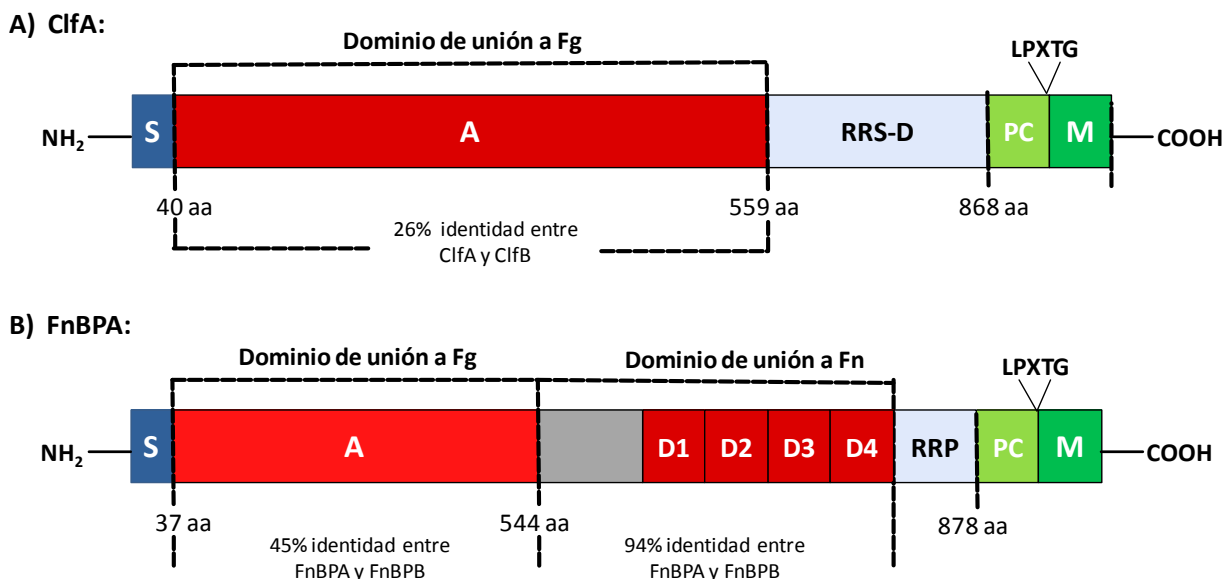


Figura 15. Esquemas de los dominios estructurales de las proteínas de *S. aureus*. En ambos casos se distinguen los dominios característicos de las MSCRAMMS. En el extremo N-terminal se encuentra la secuencia señal (S). Hacia el extremo C-terminal se disponen el dominio de anclaje a la pared celular (PC), el motivo LPXTG y el dominio hidrofóbico transmembrana. A) ClfA poseen además la secuencia repetitiva rica en residuos Serina-Aspartato (RRS-D) y el dominio funcional de unión a Fg. Se muestran los porcentajes de identidad respecto de ClfB. [Ni Eidhin y col., 1998]. B) FnBPA, posee una secuencia rica en Prolina (RRP). La proteína es capaz de unir Fn (dominios D1-4) y Fg (dominio A). Se muestran los porcentajes de identidad respecto de FnBPB. [Stanley y Luzio, 1984].

III-1-1-1. Factor de agregación A: Clf A

Otra adhesina de evidente importancia para la invasión de la glándula mamaria por *S. aureus* es la proteína ClfA. Esta molécula es capaz de unirse a Fg y fibrina. ClfA promueve la agregación de células bacterianas en el plasma, y la adherencia de bacterias a coágulos de sangre, biomateriales acondicionados a plasma y a válvulas del corazón dañadas en modelos de endocarditis en ratas [Josefsson y col., 2008]. Además se describió que ClfA tiene la habilidad de inhibir la fagocitosis de la bacteria, tal vez por un mecanismo de camuflaje con el Fg o fibrina del hospedador [Higgins y col., 2006]. *S. aureus* posee dos de éstas proteínas, ClfA y ClfB. En la figura 15.A, se presenta la estructura primaria de la proteína. El ClfA posee un dominio de unión a Fg, llamado dominio A, de 520 residuos (40-559 aa), seguido por una región R rica en repeticiones dipéptidicas serino-aspartato (RRS-D) requerida para la correcta presentación del sitio de unión sobre la superficie celular [Higgins y col., 2006; Josefsson y col., 2008]. La molécula posee hacia el extremo N-terminal la secuencia señal (S) y hacia el extremo C-terminal los dominios de anclaje a la pared celular (PC) y el dominio transmembrana (M), característicos de las MSCRAMMs.

ClfA es una molécula adecuada para incorporar en una vacuna contra *S. aureus*, ya que se cree que la mayoría de las cepas la expresan [O'Neill y col., 2000]. La prevalencia del gen en aislamientos de *S. aureus* asociadas a mastitis bovina está estimada entre un 50,6 [Klein y col., 2012] y un 96,9 % [Ote y

col., 2011], dependiendo de la zona geográfica. Además, al alinear las regiones A pertenecientes a distintos genomas de *S. aureus* secuenciados y disponibles en base de datos, se obtiene un 91-99,8% de identidad, lo cual sugiere que esta región es conservada entre las distintas cepas [Josefsson y col., 2001; Brouillette y col., 2002].

ClfA es un importante factor de virulencia en varios modelos de infección. Estudios llevados a cabo con cepas deficientes en ClfA han demostrado una menor virulencia respecto de la cepa salvaje en modelos murinos de sepsis y artritis séptica [Josefsson y col., 2001; Vernachio y col., 2003]. Estos resultados coinciden con los obtenidos al transferir el gen *clfa* a bacterias de baja patogenicidad, como *Lactococcus lactis* y *Streptococcus gondii*. Las cepas portadoras de *clfa* mostraron un aumento en la virulencia de la bacteria, permitiendo identificar a la proteína como un factor importante en las infecciones endovasculares [Que y col., 2001]. La expresión de ClfA sobre la superficie de la bacteria, también interfiere con la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, mediante mecanismos tanto dependientes como independientes de Fg [Josefsson y col., 2008]. Higgins y col. demostraron por un lado, que ClfA resulta antifagocítico al expresarlo de manera heteróloga en otro hospedador gram-positivo [Higgins y col., 2006].

Hall y col., produjeron anticuerpos monoclonales (MAbs) anti-ClfA [Hall y col., 2003] con el fin de evaluar el potencial uso de estos anticuerpos como terapia y prevención de las infecciones causadas por *S. aureus*. Por un lado, los ensayos de unión de *S. aureus* a Fg humano realizados, evidenciaron la capacidad de los MAbs de inhibir la adherencia en más de un 90%, y de desplazar hasta en un 35% a las bacterias previamente adheridas a Fg. Por otro lado, la administración de una única dosis de MAbs fue capaz de ofrecer protección contra un desafío intravenoso con cepas de *S. aureus* meticilino-resistentes, en el marco de un modelo murino de sepsis.

Numerosos trabajos evaluaron la inmunogenicidad y la eficacia de vacunas experimentales basadas en ClfA. Josefsson y col. demostraron que la inmunización de ratones con ClfA resultó ser protectora contra la artritis, así como también la inmunización pasiva con suero humano conteniendo altos títulos de IgG anti-ClfA [Josefsson y col., 2001]. En otro trabajo se evaluó la respuesta inmune generada tras una estrategia de vacunación de ratones con un plásmido que codificaba para ClfA, seguida de un refuerzo con la proteína recombinante y posterior desafío de utilizando un modelo de mastitis [Brouillette y col., 2002]. Los animales vacunados mostraron mayores porcentajes de fagocitosis y un menor número de bacterias recuperadas de las glándulas. De manera similar, la inmunización de bovinos con vacuna a ADN codificando para ClfA y la FnBPA, reforzada con una dosis de las proteínas recombinantes, confirió protección parcial a la glándula mamaria en un modelo de infección experimental de mastitis por *S. aureus* [Shkreta y col., 2004]. El grupo de animales vacunados presentó menos cuartos infectados y un

menor número de bacterias recuperadas de leche comparado con el grupo control [Shkreta y col., 2004].

III-1-1-2. Proteína de unión a fibronectina

S. aureus posee 2 genes homólogos, en tándem, *fnbpa* y *fnbpb*, que codifican para las proteínas FnBP A y FnBP B, respectivamente. Al menos uno de los dos genes están presentes en la vasta mayoría de las cepas de *S. aureus* [Brouillette y col., 2003a]. Estudios realizados sobre distintas FnBPs bacterianas, atribuyeron diversas funciones a estas moléculas, como por ejemplo capacidad de unirse a la Fn plasmática, adhesión a implantes médicos, keratinocitos, células endoteliales y tejidos traumatizados [Rice y col., 2001] y capacidad de ofrecer resistencia a la lisis mediada por complemento [Guner, 1996].

Cada FnBP tiene un peso molecular aproximado de 100 KDa, a lo largo de la cual se distinguen los dominios característicos de las proteínas de adhesión descritos anteriormente y representados en la [Figura 15.B]. Comenzado por el extremo N-terminal, contiene una secuencia señal (S), seguida de un dominio capaz de unir Fg (A) y el dominio de unión a Fn. En este último se distinguen 3 secuencias repetitivas de 37-38 aminoácidos, designadas D1, D2 y D3; seguidos de una unidad repetitiva incompleta, dominio D4 [Joh y col., 1999]. Los D1 y D2 son idénticos en 33 de los 37 aminoácidos, mientras que el D3 es más divergente. A su vez, estas repeticiones son altamente homólogas entre FnBP A y FnBP B (94 % de identidad aminoacídica), y poseen el sitio de unión a fn hacia el extremo C-terminal de cada dominio D. Si bien un dominio D aislado, tiene la capacidad de unirse a Fn, la disposición en tándem aumenta la afinidad [Sun y col., 1997; Rennermalm y col., 2001]. Hacia el final de la proteína se disponen una región rica en residuos de Prolina (RRP) y los dominios anclaje a la pared celular y transmembrana (PC y M, respectivamente).

Mientras que la mayoría de las cepas de *S. aureus*, particularmente las asociadas a enfermedades invasivas contienen ambos genes, algunas contienen sólo *fnbpa* [Burke y col., 2010]. Estudios con mutantes han mostrado que ambas proteínas median la adherencia a Fn, pero que la deficiencia en sólo uno de ellas no genera diferencias significativas respecto de la virulencia de la cepa salvaje [Burke y col., 2010].

Los resultados provenientes de estudios *in vitro* sugieren un rol importante de estas adhesinas en la colonización de la glándula mamaria. Se ha observado que las cepas de *S. aureus* aisladas de animales con mastitis clínica, se adhieren a los cultivos primarios de células epiteliales mamarias bovinas [Hensen y col., 2000]. Por ejemplo, en un trabajo que empleó mutantes isogénicas deficientes en FnBPs, los autores reportaron una disminución del 40% en su capacidad para adherirse a células MAC-T bovinas, comparado con la cepa salvaje correspondiente [Dziewanowska y col., 1999]. En un estudio interesante llevado a cabo por Reddy y Ross, se desarrolló una cámara de flujo recreando las condiciones fisiológicas

de circulación en los vasos sanguíneos y empleando cepas de *S. aureus* salvaje y mutantes deficientes en FnBPs [Brouillette y col., 2003a]. En dicho ensayo, los autores compararon la adherencia a las células endoteliales de cepas de *S. aureus* salvajes y mutantes deficientes en FnBPs. Durante 30 min se frenó el flujo para permitir que la bacteria se instalara, y luego se restauró el flujo experimental, condición que permitió demostrar que la cepa salvaje presentaba una mayor capacidad adherencia que las mutantes. De manera similar a las instancia de lactancia en la glándula mamaria, el flujo de leche no es continuo, lo cual le otorga a la bacteria la oportunidad de adherirse al epitelio mamario entre ordeño y ordeño. Brouillette y col comprobaron esta situación de analogía, utilizando un modelo murino de mastitis [Brouillette y col., 2003a]. Demostraron que las FnBPs de *S. aureus* son un factor de virulencia crucial para la colonización de la glándula mamaria, ya que la adhesión al tejido mamario le permite superar las fuerzas de expulsión durante el ordeño.

Distintos estudios *in vitro* demostraron que la unión de la bacteria a Fn inmovilizada puede ser inhibida por anticuerpos específicos. En un modelo de mastitis en ratón, se infectaron las glándulas mamarias con suspensiones de *S. aureus* previamente opsonizadas con anticuerpos generados contra FnBP recombinante [Mamo y col., 1995]. El número de bacterias recuperadas y la severidad del daño en el tejido mamario resultó significativamente menor, comparado con el producido por las bacterias sin pre-tratar. También se han obtenido resultados prometedores en modelos bovinos. La inmunización de vaquillonas preñadas con un fragmento recombinante conteniendo 2 motivos D de la FnBP adyuvantado con Iscom MatrixTM, indujo una fuerte producción de anticuerpos, incluyendo IgG₁ e IgG₂, tanto en sangre como en leche. La misma se prolongó durante toda la lactancia, y los anticuerpos generados fueron capaces de aumentar la fagocitosis por PMN en ensayos *in vitro* [Morein y col., 2011].

III-1-2. Determinante H de superficie regulado por hierro (*iron-regulated surface determinant H*): IsdH.

La IsdH de *S. aureus*, también denominada en bibliografía HarA, pertenece a un sistema de captación del hierro, Isd (del inglés: “*Iron-regulated Surface Determinants*”), que la bacteria desarrolló para lograr la colonización de los tejidos.

El hierro es un nutriente esencial para la supervivencia de cualquier patógeno y el desarrollo del proceso de infección [Skaar y Schneewind, 2004; Haley y col., 2011]. A pesar de que en el organismo hay altas cantidades de hierro para soportar el crecimiento bacteriano, la evolución proveyó a los animales de mecanismos para limitar la disponibilidad, por ejemplo baja solubilidad del hierro a pH fisiológico, localización intracelular del nutriente y el secuestro del hierro mediante proteínas de unión como hemoproteínas, transferrina, lactoferrina [Skaar y Schneewind, 2004]. Estas estrategias constituyen una de las defensas innatas más importantes contra las infecciones bacterianas, ya que el hierro es el único

nutriente limitante para el crecimiento de las bacterias en el organismo hospedador [Skaar y Schneewind, 2004].

Los eritrocitos circulantes son las células con mayor contenido de hierro del cuerpo, conteniendo entre el 60-75% de hierro del organismo unido a la hemoglobina (Hb). Por lo tanto, la hemoglobina es la reserva más abundante de hierro en el organismo de cualquier mamífero, lo que la ha convertido en una atractiva fuente de hierro para los patógenos [Pishchany y Skaar, 2012].

S. aureus es capaz de sobrevivir en los fluidos con concentraciones de hierro de sólo 0.04 μ M [Trivier y Courcol, 1996]. En estas condiciones limitantes la bacteria expresa el sistema Isd de captación del hierro. El sistema Isd está compuesto por proteínas de superficie (IsdABCH) ancladas a la pared celular de la bacteria a través de dos sortasas (srtA y srtB), un transportador de membrana (IsdDEF) y proteínas citoplasmáticas (IsdGI) [Skaar y Schneewind, 2004; Watanabe y col., 2008]. Los receptores del sistema Isd, IsdA, IsdB, IsdC e IsdH, contienen una ó más copias de los dominios de transportación de hierro NEAr (NEAT, del inglés “NEAr transporter”), motivos de 125 residuos que unen Hb y hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp) [Pilpa y col., 2006; Watanabe y col., 2008]. Haley y col., describen el mecanismo de captación del hierro propuesto hasta el momento [Figura 16.A] [Haley y Skaar, 2012]. IsdB ó IsdH inician el proceso de captación de hierro mediante la unión de Hb ó Hb-Hp a los dominios NEAT. Subsecuentemente IsdB remueve el hemo el cual es transferido por afinidad a IsdA y luego a IsdC. IsdC transfiere directamente el hemo al complejo transportador IsdDEF localizado en la membrana plasmática, el cual ingresa el hemo hacia el citoplasma donde es degradado por las monooxigenasas IsdG e IsdI para ser empleado como nutriente por *S. aureus*.

Particularmente, la IsdH, también denominada Har A, es una proteína de 893 aminoácidos, que pertenece a una subfamilia de la superfamilia de las inmunoglobulinas, las cuales comprenden dominios NEAT. En la figura 17.B, se muestra el esquema estructural de la proteína. IsdH posee un motivo LPXTG que implica que se expresa anclada a la pared [Skaar y Schneewind, 2004; Pilpa y col., 2006] y una secuencia señal (S). IsdH contiene 3 regiones NEAT: N1, que se extiende del aminoácido 86 al 229; N2 va del 326-468; N3 desde el aminoácido 539 al 664 [Skaar y Schneewind, 2004]. N1 y N2 son compartidos con IsdB y se demostró que son suficientes para la actividad de unión al ligando; mientras que D3 aún no está bien caracterizado [Pilpa y col., 2006]. Los dominios NEAT de la IsdH, sólo se ha demostrado hasta el momento, que unen a Hb, Hp ó complejos Hb-Hp [Dryla y col., 2003].

Distintos trabajos demuestran la importancia de algunas moléculas del sistema Isd en la virulencia bacteriana. Corrigan y col., evaluaron el rol de la IsdA y otras cuatro proteínas de superficie (ClfB, SdrC, SdrD y SdrE) en la adherencia de *S. aureus* a las células escamosas nasales aisladas a partir de humanos voluntarios [Corrigan y col., 2009]. Emplearon mutantes de *Lactococcus lactis* que expresaban las proteínas en estudio y cepas de *S. aureus* deficientes en dichas proteínas. Los resultados demostraron

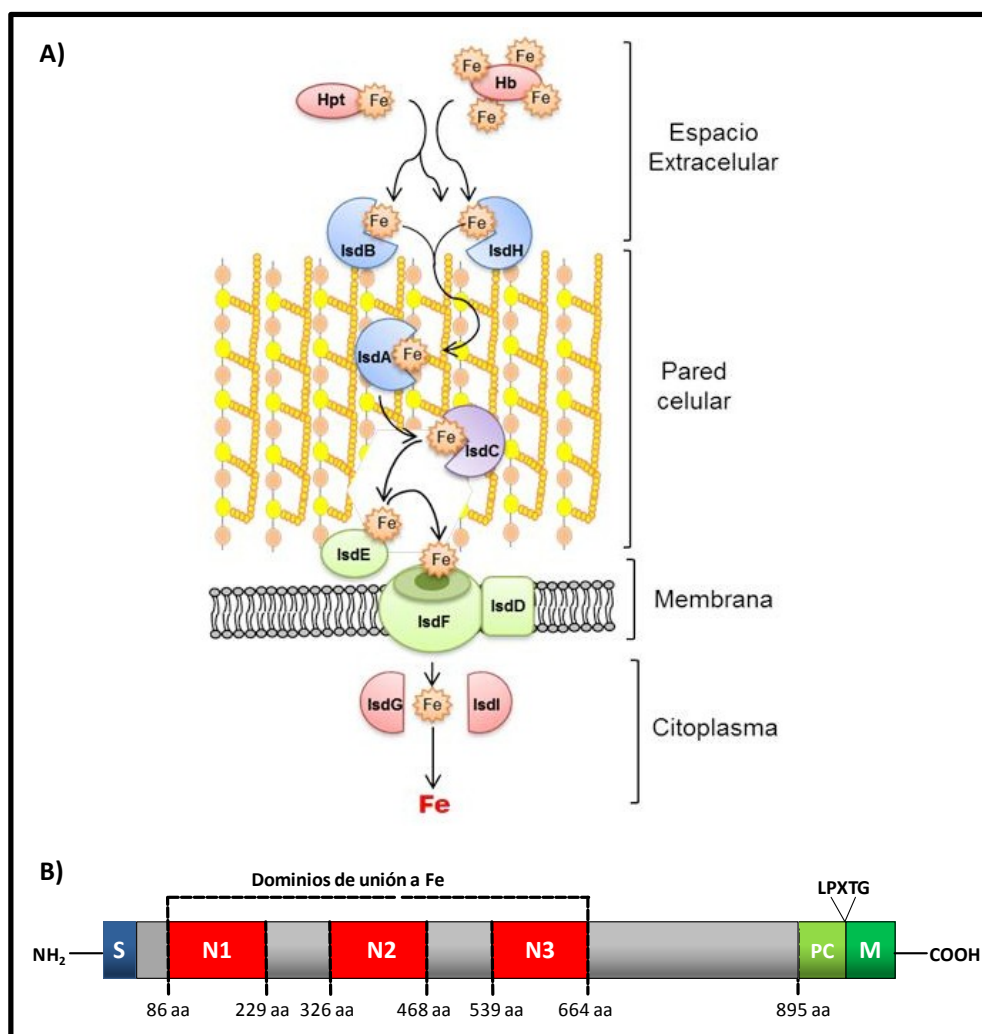


Figura 16. A) Mecanismo propuesto para el transporte de hierro mediado por el sistema Isd de *S. aureus*. IsdA, IsdB e IsdH se encuentran ancladas a la pared celular. IsdB e IsdH funcionan como receptores para las hemoproteínas, que incluyen la haptoglobina, hemoglobina y el grupo hemo. Una vez captadas, el grupo hemo es removido de las hemoproteínas y transferido a IsdA y luego a IsdC. IsdC transfiere el hemo al transportador de la membrana celular, conformado por las proteínas IsdDEF, para finalmente alcanzar el citoplasma. Las hemo-monooxigenasas IsdG e IsdI, degradan el grupo hemo y el hierro es liberado en el citoplasma para ser utilizado como nutriente por la bacteria. [Skaar y Schneewind, 2004]. **B) Esquema de los dominios estructurales de IsdH.** En el extremo N-terminal, la proteína cuenta con una secuencia señal (S). Hacia el extremo C-terminal se distinguen los motivos de anclaje a la pared celular (PC), el motivo LPXTG para sortasa y el dominio hidrofóbico transmembrana (M). El dominio de unión a Fe, está constituido por 3 dominios NEAT (N1-3), capaces de interactuar específicamente con la Hb ó complejos Hb-Hp. [Pilpa y col., 2006; Zapotoczna y col., 2012].

que IsdA contribuye a la adherencia de la bacteria, y que dicha habilidad es multifactorial, involucrando también a las otras proteínas bacterianas evaluadas. Visai y col., reportaron que IsdH tiene un efecto antifagocítico, al promover una rápida conversión de C3b en C3d, interfiriendo en la función de las opsoninas del complemento [Visai y col., 2009]. Dado el rol de C3b en la formación de C5 convertasa, IsdH también interferiría con la formación del componente soluble C5a del complemento [Visai y col., 2009]. Recientemente, Krishna Kumar y col., demostraron la importancia de la captación de Hb por la IsdH en la supervivencia de *S. aureus* [Krishna Kumar y col., 2011]. Para esto, realizaron mutaciones en la

estructura de la Hb de manera de generar moléculas defectuosas en la unión a IsdH. La captura física de la molécula de Hb por los receptores NEAT de IsdH ó IsdB, es de crucial importancia para la activación de la transferencia del grupo hemo [Krishna Kumar y col., 2011]. La demostración de que el reconocimiento de la Hb es altamente específico, lleva a la posibilidad de diseñar estrategias dirigidas a inhibir la unión, para interrumpir el proceso de captación y utilización del hierro por *S. aureus*.

En la leche, el hierro está presente en muy bajas concentraciones (10^{-8} M), y la mayoría está unido a proteínas del hospedador, incluyendo la lactoferrina, transferrina, por lo que la concentración de hierro libre es insuficiente para el desarrollo del patógeno [Andrews y col., 2003]. Por lo tanto, el sistema Isd también tiene crucial importancia durante las infecciones de la glándula mamaria [Ster y col., 2010]. En la leche, el hierro está presente en muy bajas concentraciones (10^{-8} M), y la mayoría está unido a proteínas del hospedador, incluyendo la lactoferrina, transferrina, por lo que la concentración de hierro libre es insuficiente para el desarrollo del patógeno [Andrews y col., 2003]. Por lo tanto, el sistema Isd también tiene crucial importancia durante las infecciones de la glándula mamaria [Ster y col., 2010].

Se han evaluado algunas vacunas empleando IsdH como inmunógeno. Clarke y col., inmunizaron ratas con IsdA e IsdH y lograron generar protección contra las infecciones nasales por *S. aureus* [Clarke y col., 2006]. En otro estudio se evaluó la antigenicidad de IsdB e IsdH en bovinos [Ster y col., 2010]. Pre-incubaron bacterias con sueros obtenidos de la inmunización de conejos con IsdH, e infectaron las glándulas mamarias de bovinos con dichas bacterias. Los anticuerpos generados contra la IsdH, fueron capaces de neutralizar la bacteria y prevenir el desarrollo de la infección por *S. aureus*.

III-1-3. Toxinas

III-1-3-1. Toxina alfa (Atox)

La observación de que el cultivo de *S. aureus* en agar sangre producía una zona clara o halo alrededor de las colonias, llevó al descubrimiento de que la bacteria era capaz de producir algunos agentes hemolíticos, entre los que se destaca la Atox [Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991].

Inicialmente, la α tox se denominó α -hemolisina dado la propiedad de producir la lisis de glóbulos rojos. Luego, los avances en la caracterización de dicha proteína, evidenciaron que las células nucleadas presentaban diferentes respuestas frente a la toxicidad de la α tox, sugiriendo que la proteína actuaba mediante mecanismos mucho más complejos [Berube y Bubeck Wardenburg, 2013]. Dado el amplio rango de especificidades celulares, la molécula comenzó a denominarse α -toxina.

Altos porcentajes de cepas de *S. aureus* son capaces de producir esta proteína. Entre las cepas aisladas de casos de mastitis, se ha reportado un prevalencia del gen que codifica para la Atox (*hla*) de un 99-100% [Kenny y col., 1992; Aarestrup y col., 1999]. Aunque al analizar la expresión de la toxina, los

resultados de los estudios son discordantes. En un estudio llevado a cabo en EE. UU, se serotipificaron 262 cepas de *S. aureus* provenientes de mastitis bovinas, resultando un 94,3% positivas para α -toxina [Kenny y col., 1992]. Sin embargo, en un estudio posterior realizado en Dinamarca con 105 cepas de *S. aureus*, se observó que el 100% de ellas presentaban el gen que codifica para la toxina, pero sólo el 37% produjeron la toxina *in vitro* [Aarestrup y col., 1999].

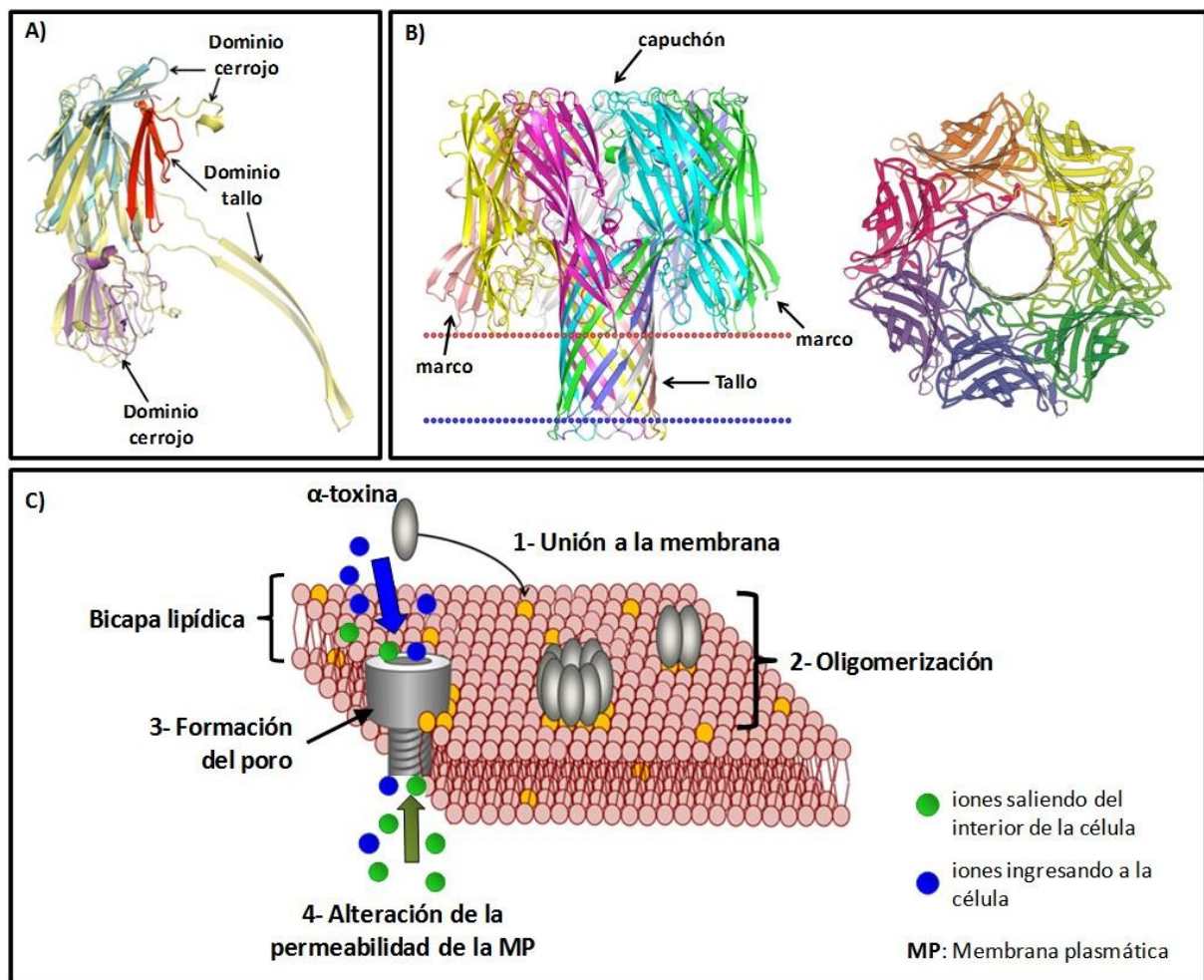


Figura 17. Estructura de la α -toxina de *S. aureus* y mecanismo de formación del poro. A) Estructura terciaria del monómero de la Atox. (Adaptado de [Huyet y col., 2013]). B) Estructura cuaternaria del heptámero de Atox, vista lateral y superior. (Extraídos, respectivamente, de la base de datos OPM (*Orientation of proteins in membranes*) y de <http://www.sciencephoto.com/media/471125/viewsciencephotolibrary>). C) Mecanismo de formación del poro sobre la membrana plasmática de una célula susceptible. La Atox una vez unida a la membrana plasmática de las células, comienza a oligomerizar formando el heptámero en forma de horquilla. Esta atraviesa la MP generando un poro, el cual permeabiliza la célula, contribuyendo al intercambio descontrolado de iones Ca^{2+} y K^+ que llevan a la lisis celular. [Sukumwang y Umezawa, 2013].

La Atox consiste en una proteína de 293 aa, de 33 KDa de peso molecular, contiene un péptido señal de la secreción de 26 aa y está compuesta casi completamente de láminas β con algunas pocas estructuras de α -hélices [Berube y Bubeck Wardenburg, 2013]. *S. aureus* secreta la proteína como un monómero

soluble, capaz de unirse y oligomerizar sobre la membrana celular del hospedador en una estructura heptamérica con forma de anillo [Song y col., 1996] [Figura 17.A y B]. Sobre las células susceptibles, este proceso culmina en la formación de una horquilla que atraviesa la bicapa lipídica eucariota, generando un poro de 1-3 nm. La estructura heptamérica comprende tres grandes dominios [Song y col., 1996; Dinges y col., 2000]. El dominio capuchón (en inglés: *cap*), se dispone sobre la cara extracelular de la toxina, constituyendo el entorno de entrada al poro. El dominio cerco (en inglés: *rim*) está yuxtapuesto sobre la capa más externa de la membrana plasmática del hospedador. Finalmente, se diferencia el dominio tallo que constituye el poro propiamente dicho, el cual perfora la membrana. La formación del poro altera la permeabilidad de la membrana, generando un flujo descontrolado de iones Ca^{2+} y K^+ , ATP, moléculas de bajo peso molecular [Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991] [Figura 17.C]. En condiciones subléxicas de intoxicación, se han observado otros efectos biológicos, como alteración de las vías de señalización que gobiernan la proliferación celular, respuestas inflamatorias, secreción de citoquinas, interacciones célula-célula [Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991; Berube y Bubeck Wardenburg, 2013].

El rol de la Atox en la virulencia bacteriana ha sido muy estudiado. En un primer momento se observó que los eritrocitos de conejo eran altamente susceptibles a lisarse por acción de la toxina [Berube y Bubeck Wardenburg, 2013]. Posteriormente, la observación de Siegel y Cohen, de que la Atox causaba agregación de plaquetas humanas en concentraciones subléxicas [Siegel y Cohen, 1964], desencadenó numerosos estudios que demostraron que la proteína era capaz de actuar sobre diferentes tipos celulares humanos, incluyendo células epiteliales, endoteliales, células hematopoyéticas como los linfocitos T, monocitos, macrófagos y neutrófilos [Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991; Berube y Bubeck Wardenburg, 2013]. Además de la muerte celular, se han reportado distintos efectos secundarios, como estimulación de productos eicosanoides, alteración de procesos secretorios, disfunción celular, activación de endonucleasas, inmunomodulación mediante la inducción de la liberación de citoquinas [Berube y Bubeck Wardenburg, 2013].

Numerosos trabajos empleando cepas de *S. aureus* deficientes en la Atox, evidenciaron que la ausencia de la proteína reduce la virulencia de la bacteria en numerosos modelos animales de neumonía, infecciones dermonecróticas de la piel, sepsis, peritonitis, infecciones de la córnea, sistema nervioso central y glándula mamaria [Berube y Bubeck Wardenburg, 2013]. Respecto a éstas últimas, se ha corroborado el rol relevante de la Atox en modelos animales de mastitis [Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991; Camussone y Calvino, 2013]. Estudios tempranos realizados infectando murinos con cepas de *S. aureus* mutantes para la toxina y las cepas parentales salvajes, han permitido asociar la expresión de Atox con mayores recuentos bacterianos en las glándulas infectadas, signos más graves, e incluso la muerte [Bramley y col., 1989]. Posteriormente, Cifrian y col., observaron que al pre-tratar monocapas de células epiteliales de la glándula mamaria con la toxina, incrementaba la susceptibilidad celular a la adherencia

de *S. aureus* [Cifrian y col., 1995]. Más recientemente se trataron cultivos primarios de células epiteliales mamarias (BMEC, del inglés “Bovine Mammary Epithelial Cells”) con la Atox, obtuyéndose un incremento en la muerte celular, en la degradación del ADN genómico y en la producción de especies reactivas del oxígeno, de una manera dependiente de la dosis de proteína [Seol y col., 2010].

Los anticuerpos anti-Atox, han demostrado resultar eficientes en neutralizar los efectos letales de la proteína en modelos experimentales. Distintos trabajos en los que inmunizaron ratones de manera pasiva con anticuerpos anti-Atox, obtuvieron protección frente a desafíos con la proteína nativa o cepas de *S. aureus* productoras de la toxina, menores recuentos de bacterias en los tejidos infectados y menor diseminación hacia otros tejidos [Cifrian y col., 1995; Adhikari y col., 2012]. También se ha reportado el potencial de Atox como inmunógeno contra la mastitis bovina. Heberlin y col., inmunizaron repetidamente vacas en lactancia con la Atox, Atox y CP5 ó Atox conjugada a CP5 [Herbelin y col., 1997]. El desafío intramamario con α -toxina, 2 semanas después de la inmunización, indujo un reclutamiento celular masivo en los cuartos desafiados, con incremento de los niveles de anticuerpos específicos anti-Atox, no observado en los cuartos de los controles sin inmunizar.

III-1-3-2. Toxina beta (Btox)

Se tiene escasa información acerca de la Btox de *S. aureus* [Huseby y col., 2007]. Observaciones tempranas indicaron la predominancia de cepas productoras de Btox entre *S. aureus* aislados de mastitis bovinas [Bryce y Rountree, 1936], lo que hizo suponer un rol importante de la misma en la patogénesis de *S. aureus* en la glándula mamaria bovina. Distintos trabajos determinaron que la prevalencia del gen que codifica para la toxina (*h/b*) es de un 99-100% entre los aislamientos bovinos de *S. aureus* [Aarestrup y col., 1999; Larsen y col., 2002; Ote y col., 2011], y es capaz de ser producida por un 75-100% de los mismos [Herbelin y Poutrel, 1995; Huseby y col., 2007].

La Btox es una proteína de 35 KDa, que pertenece a la superfamilia de proteínas tipo DNAsa I [Huseby y col., 2007]. La hemolisina posee actividad de fosfolipasa (ó esfingomielinasa), que actúa sobre la esfingomielina de la capa externa de las membranas plasmáticas de los eritrocitos, mostrando una toxicidad incrementada en presencia de Mg^{2+} [Herbelin y Poutrel, 1995; Huseby y col., 2007]. La proteína también tiene una acción inducida por calor-frío, particularmente sobre eritrocitos ovinos. A 37°C la Btox actúa sobre los GR de ovejas sin lizarlos, pero si posteriormente son incubados a 4°C, ocurre la lisis [Huseby y col., 2007]. Este fenómeno se visualiza sobre placas de agar sangre como una hemólisis incompleta a 37°C y una hemólisis completa a 4°C. La acción de la Btox no produce la lisis celular, sino que desestabiliza la célula, volviéndola vulnerable a otros agentes líticos [Herbelin y Poutrel, 1995]. La estructura y mecanismos de acción de la hemolisina se muestran en la figura 18. La Btox es capaz de ejercer daño sobre las membranas de diferentes tipos de células *in vitro*, entre las que se encuentran, neutrófilos [Marshall y col., 2000], monocitos y linfocitos T proliferativos [Huseby y col., 2007].

Algunos trabajos han demostrado que la Btox tiene un rol durante las invasiones intracelulares. Shompole y col., demostraron que el escape de *S. aureus* de los endosomas coincide con un pico de expresión de los genes *hla* y *hlb*, mientras que el daño a las membranas de las células citoplasmáticas infectadas ocurre luego de un segundo pico de producción [Shompole y col., 2003]. De manera similar, en un estudio reciente, una cepa de *S. aureus* doble mutante deficiente en las moléculas Btox y catalasa, mostró un incremento de la persistencia intracelular en cultivos *in vitro* de macrófagos murinos y células MAC-T, en comparación con las mutantes simples o la cepas salvajes [Martinez-Pulgarin y col., 2009].

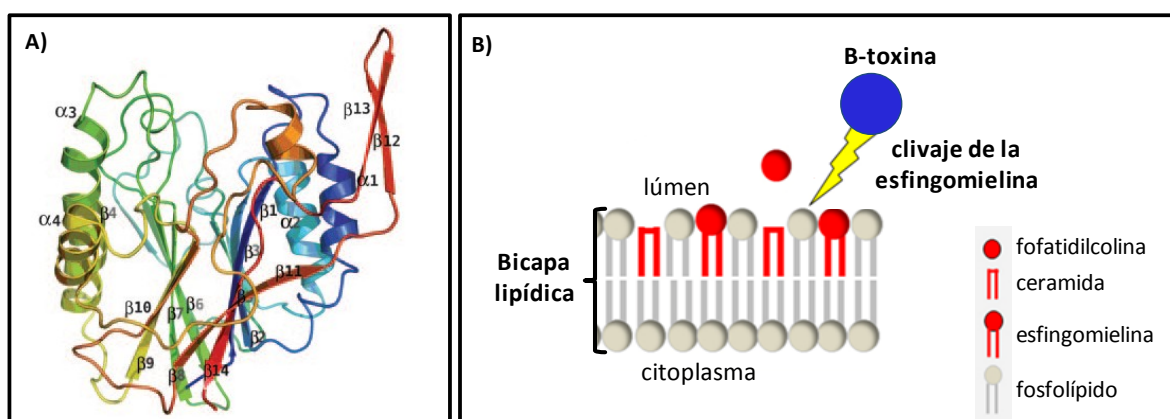


Figura 184. Estructura de la Btox de *S. aureus* y mecanismo de acción. A) Estructura terciaria. Se muestran las estructuras secundarias de láminas β y α-hélices. Los colores van desde el azul, correspondientes al extremo amino, hasta el rojo, correspondientes al extremo C-terminal. [Huseby y col., 2007]. B) Actividad de esfingomiélinasa. La Btox actúa hidrolizando la esfingomiéline de las membranas plasmáticas en ceramida y fosfatidilcolina, lo cual desestabiliza la membrana, permeabilizando la célula. [Fraunholz y Sinha, 2012].

La importancia de la Btox en las IIM ha sido claramente demostrada en distintos trabajos. Utilizando un modelo de mastitis murino, Calvinho y col., evaluaron el poder patógeno de la toxina empleando la proteína parcialmente purificada o una cepa aislada de mastitis bovina productora solamente de Btox, mediante inoculación en glándulas mamarias de ratón. La administración de toxina parcialmente purificada produjo sólo una leve infiltración de neutrófilos en los alvéolos, mientras que la inyección de *S. aureus* productores de Btox, pero no de Atox ni delta-toxina, generó lesiones vasculares severas con presencia de agregados de bacterias [Calvinho y col., 1993], sugiriendo que el rol patogénico de la misma podría estar influenciado por la interacción con otras enzimas y toxinas del organismo. Posteriormente, Huseby y col., también observaron un efecto de evasión del sistema inmune, que implicaba la interacción la toxina con factores de virulencia accesorios, como superantígenos, contribuyendo a la modulación del sistema inmune del hospedador [Huseby y col., 2007]. En 1989, Bramley y col., generaron mutantes deficientes en la toxina mediante lisogenización con un bacteriófago que se integra en el gen codificante [Bramley y col., 1989]. Las glándulas inoculadas con *S. aureus*

productores de toxina mostraron recuentos significativamente mayores que aquellas inoculadas con las cepas mutantes, así como un mayor número de PMN y macrófagos. Los ratones infectados con las cepas toxigénicas murieron o presentaron signos más severos de enfermedad, en comparación con los infectados con las cepas mutantes. De la misma manera que para la Atox, el grupo de Cifrian y col., mediante su estudio empleando células epiteliales mamarias tratadas con cepas mutantes de *S. aureus* deficientes en Btox ó con las correspondientes cepas parentales, lograron adjudicarle a la Btox un rol en la adherencia bacteriana, el número de células epiteliales infectadas, así como en la proliferación del microorganismo [Cifrian y col., 1996]. Frente a este resultado, los autores propusieron que el efecto de la Btox en el incremento de la adherencia de *S. aureus* a las células epiteliales de la glándula mamaria se debería a un cambio en la carga de la superficie de las células dañadas.

Existen pocos antecedentes de la utilización de esta toxina en preparaciones de inmunógenos destinadas al control de infecciones por *S. aureus*. En un estudio realizado en Noruega, se inmunizaron vaquillonas preñadas con un inmunógeno compuesto por una cepa de *S. aureus* encapsulada inactivada mezclada con los toxoides α y β [Nordhaug y col., 1994a]. Los animales inmunizados desarrollaron niveles elevados de IgG anti-cápsula y anti- α -toxina, aunque los niveles de anticuerpos específicos para Btox no difirieron significativamente de los presentes en los animales control. La formulación tampoco resultó efectiva en reducir la aparición de mastitis clínicas o subclínicas de forma significativa. En un estudio posterior con vacas en lactancia, Hwang y col., aislaron cepas de *S. aureus* productoras de α y β hemólisis de vacas con mastitis subclínicas, y a partir de las mismas realizaron preparaciones de bacterina-toxoide, que utilizaron para la inmunización autógena de los animales [Hwang y col., 2000]. La inmunización indujo un incremento significativo de los anticuerpos específicos en los animales inmunizados y resultó en la cura bacteriológica del 27% de los cuartos infectados (comparando con un 5% del grupo control). Además, no se registraron nuevos cuartos infectados en los animales inmunizados, mientras que 3 cuartos en el grupo control presentaron nuevas IIM.

III-2. MATERIALES Y MÉTODOS

III-2-1. Obtención de las secuencias codificantes para ClfA y FnBPA.

III-2-1-1. Cepas de *S. aureus*

Se utilizó la cepa de referencia Reynolds de *S. aureus*, para amplificar los fragmentos genómicos correspondientes a las proteínas de interés.

Para conservar las cepas durante largos períodos de tiempo, a partir de una colonia aislada se sembró en CTS, incubándose toda la noche a 37°C. Se transfirieron 750 µl del cultivo a un criovial de 2 ml que contenía un volumen igual de CTS suplementado con glicerol 15% (v/v). Se mezcló y conservó a -70°C.

III-2-1-2. Purificación del ADN genómico de *S. aureus*

El stock de la cepa Reynolds conservada a -70°C, se plaqueó en agar tipteína soya (Britania) y se dejó crecer 18 h a 37°C. Se repicó una colonia aislada de dicha placa en 10 ml de CTS y se incubó otras 18 h, a 37°C con agitación. Las bacterias se recolectaron por centrifugación, 10 min a 8000 rpm y se procedió a la purificación del ADN genómico. Las bacterias se resuspendieron en 500µl de Tris-HCl 10mM, pH=8 y 2,5 mg/ml de lisozima. Se incubaron 2 h en baño termostatzado a 37°C. Luego se agregó 1 ml de buffer de lisis y 1 mg/ml de proteinasa K, se mezcló suavemente por inversión y se llevó a baño de agua a 50°C durante 2 h. Se incorporó una mezcla 1:1 de fenol: cloroformo, se mezcló por inversión 2 min y se centrifugó 15 min a 10.000 rpm. A la capa acuosa superior se le agregó una mezcla 24:1 de cloroformo: isoamílico. Luego de agitar hasta lograr la mezcla de las dos fases, se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min, y al sobrenadante se agregaron 50 µl de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol frío al 95%. Se dejó precipitando 3 h y se recuperó el ADN por centrifugación 20 min a 13.000 rpm. El pellet se lavó con 500 µl de etanol frío al 70%, se centrifugó nuevamente 5 min a 14.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se secó el pellet en estufa a 37°C durante 30 min. Finalmente el ADN se resuspendió en 50 µl de H₂O_{mq} y se inactivaron ADNasas incubando 3 h en baño de agua a 45°C. La calidad del ADN extraído se chequeó corriendo en un gel de agarosa al 1 % [III-3-1-4].

III-2-1-3. Reacción de PCR para obtener Atox, ClfA, FnBPA o IsdH

Se llevó a cabo una reacción de PCR para obtener las regiones codificantes de los fragmento deseados de cada proteína. Se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos para cada secuencia con el programa Primer Select, perteneciente al software “DNA Star”, los cuales se corrigieron manualmente para disminuir las probabilidades de formación de horquillas dentro de las secuencias y la dimerización de los oligonucleótidos. Los mismos fueron sintetizados comercialmente (Productos Bio-lógicos). En la tabla 5 se describen las características de los oligonucleótidos y los números de accesos de las

secuencias utilizadas para el diseño. En los extremos 5' se introdujeron sitios de corte para enzimas de restricción para facilitar el posterior clonado de las secuencias obtenidas en las reacciones de PCR.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo la siguiente mezcla de reactivos (Productos Bio-Lógicos, Argentina): 5 µl de buffer 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,3 µM de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido (específicos para Atox, Clf40, FnBPD1-3 o IsdHN1-2, según corresponda), 1,5 U de Taq ADN polimerasa y 50 ng de ADN genómico. Se realizaron controles negativos utilizando una mezcla formulada de igual manera a lo descrito anteriormente, pero reemplazando el volumen de ADN molde por H₂O_{mq}. Se usó el mismo programa de ciclado para todos los casos. Se realizó una desnaturalización inicial del ADN molde de 5 min a 94°C y luego 30 ciclos, cada uno conformados por los siguientes pasos: 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min de hibridización (ver la tabla 5 para el detalle de las temperaturas de hibridización), extensión de 1,5 min a 72°C. Finalmente se realizó una extensión final de 10 min a 72°C.

Tabla 5. Oligonucleótidos cebadores utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación los fragmentos codificantes para Clf40, FnBPD1-3, IsdHN1-2 y Atox de *S. aureus*.

| Fragmento proteico | N° de acceso en el Genbank | Oligo | Secuencia (5'-3') | Enzima de restricción incorporada | T° de Hibridización |
|--------------------|----------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Clf40 | Z18852 | sentido | gaattcGAAAATAGTGTACGCAATCT | EcoR I | 51°C |
| | | antisentido | gtcgacCTCTGGAAATTGGTTCAATTC | Sal I | |
| FnBPD1-3 | AJ629121.1 | sentido | gaattcGGTGGCCAAAATAGCGGTA | EcoR I | 51°C |
| | | antisentido | gtcgacTTGGTGGCAGATTGGAG | Sal I | |
| IsdHD1-2 | AP009351.1 | sentido | gaattcAACACTGCGAAAACTAT | EcoR I | 43°C |
| | | antisentido | gagctcTTCATCCACATAGTCGTC | Sac I | |
| Atox | BX571857.1 | sentido | gaattcCGGTACTACAGATATTGG | EcoR I | 45°C |
| | | antisentido | gagctcTGTCATTTCTTTTCC | Sac I | |

III-2-1-4. Análisis de los productos de amplificación

Para la evaluación de los productos de ADN obtenidos, se sembraron las muestras en la proporción correspondiente de buffer de muestra 6x en geles al 1% de agarosa [AII]. Los geles fueron preparados en buffer TAE 1X, adicionándose 10 µg de bromuro de etidio (Sigma) cada 20 ml de solución de gel. Las corridas electroforéticas se realizaron en cubas horizontales (BioRad) en el mismo buffer a 90 V. En paralelo a las muestras se corrió un marcador de tamaño compuesto de fragmentos de ADN de entre 100 bp a 3000 pb (Ladder 100 pb, Productos Bio-Logicos). Los fragmentos de ADN resueltos en el gel se visualizaron en un transiluminador de luz UV (λ 255 nm) (Fotodyne N3/3002).

III-2-1-5. Purificación de los fragmentos amplificados

Para aislar los fragmentos de interés, se corrió todo el ADN obtenido en la reacción de PCR en un gel de agarosa, según se describió anteriormente [III-2-1-4]. Una vez identificada la banda a purificar, se cortó la porción de gel que la contenía y se purificó el fragmento utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III-2-2. Clonado de Atox, Clf40, FnBPD1-3, IsdHN1-2

III-2-2-1. Cepas bacterianas empleadas

El clonado se realizó en el sistema bacteriano *Escherichia coli*, empleando las cepas DH5- α y BL-21. Las características de dichas cepas se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en las técnicas de clonado molecular y expresión de las proteínas recombinantes.

| Cepa | Genotipo | Referencia |
|------------------------------|---|-------------|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE-3) | F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) | Novagen® |
| <i>E. coli</i> DH5- α | F ⁻ Φ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 | Invitrogen® |

III-2-2-2. Vectores Plasmídicos

Las características de los vectores plasmídicos utilizados para el clonado de las secuencias codificantes se describen en la tabla 7.

Tabla 7. Vectores plasmídicos utilizados para el clonado de los fragmentos codificantes.

| Plásmido | Características | Referencia |
|-------------|--|------------|
| pGEM-T easy | 3018 pb, resistencia a Ampicilina, promotor T7, linealizado, extremos 3' con agregado de T. Este vector fue utilizado para el subclonado de productos de PCR en la cepa DH5 α de <i>E. coli</i> . | Promega® |
| pET-32a | 5900 pb, resistencia a Ampicilina, promotor T7lac, produce proteínas fusionadas a 6 Histidinas y a la proteína tiorredoxina (TRX), de 20,4 kDa, lo que permite su purificación en columna de NTA-Ni ²⁺ . Este vector fue utilizado como sistema de expresión en la cepa BL21(DE3) de <i>E. coli</i> . | Novagene® |

III-2-2-3. Minipreparación del ADN plasmídico

Se cultivaron *E. coli* BL-21 (DE3) portando el plásmido pET32a y *E. coli* DH5α portando el pGEM-T Easy en 10 ml de medio LB [AII] suplementado con 0,1 mg/ml de ampicilina, a 37°C durante toda la noche en agitación a 180 rpm. El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El ADN plasmídico se purificó a partir del pellet celular con el kit comercial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Canadá), según instrucciones del fabricante.

III-2-2-4. Subclonado de Atox, Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2 en el vector pGEM T-easy

Con los fragmentos codificantes previamente purificados [III-2-1-5], se ligaron al vector pGEM T-easy (Promega, Canadá) según el protocolo descrito por el fabricante y se transformaron células de *E. coli* DH5α [III-2-2-6]. Para identificar las colonias positivas se realizaron PCR de colonias. Se repicaron las colonias en H₂O_{mq} y se mantuvieron en ebullición durante 5 min. Se centrifugaron a 5000 rpm, 5 min y 1 µl del sobrenadante se usó como muestra para reacciones de PCR siguiendo el protocolo y programa de ciclado ya descrito [III-2-1-3]. A Los clones que dieron fragmentos de amplificación del tamaño correspondiente a Atox, Clf40, FnBPD1-3 e IsdHD1-2, se les realizó una minipreparación de ADN plasmídico [III-2-2-3] y se enviaron a secuenciar con los oligonucleótidos Sp6 (C.I.C.V.yA. INTA-Castelar, Bs. As) para corroborar la identidad de los clones obtenidos.

Los resultados de las secuenciaciones se analizaron con el programa Basic Local Alingment Search Tool (BLAST®) disponible en internet (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Con ayuda de la herramienta de traducción de proteínas del Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) se verificó que la secuencia no presente codones de terminación de la traducción.

III-2-2-5. Digestión con enzimas de restricción

Corroboradas la obtención de clones positivos para Clf40, FnBPD1-3 e IsdHD1-2 en el vector T-easy, se procedió al clonado de los mismos en el vector de expresión pET32-a.

Para esto, tanto las minipreparaciones del vector pGEM T-easy conteniendo los fragmentos codificantes, como del vector pET32-a [III-2-2-3], se cortaron con las endonucleasas de restricción EcoRI y SalI, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, EE.UU.). 0,1- 1 µg de los fragmentos codificantes o de vector, se mezclaron con 0,1 mg/ml de albúmina sérica bovina y 3 U de cada enzima, en un volumen final de 20 µl. Las reacciones de digestión se incubaron 2 h a 37°C y luego se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Las bandas correspondientes a los fragmentos liberados tras el corte del T-easy y el pET32-a cortado se purificaron a partir del gel de agarosa utilizando un kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Canadá).

III-2-2-6. Clonado de los fragmentos Atox, Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2 en el vector pET32-a

Los fragmentos cortados se mezclaron con el vector pET32-a en una relación molar 3:1. A la mezcla se le adicionaron 1 μ l de buffer 10X de la T4 DNA Ligasa (Promega, Canadá) para un volumen final de 10 μ l y 2 U de la enzima T4 DNA Ligasa (Promega, Canadá). La reacción de ligación se incubó toda la noche a 4°C.

Con el producto de ligación se transformaron células de la cepa BL-21 de *E. coli*. Las bacterias se cultivaron en medio líquido LB, a 37°C y en agitación a 180 rpm durante 18 h. Se realizó una dilución 1/100 del cultivo anterior en LB fresco y se dejó crecer aproximadamente 2 h, en las mismas condiciones, hasta alcanzar una D.O= 0,5- 0,6 a 600 nm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 500 μ l de solución de transformación 1 (ST1) [AII]. Se centrifugó nuevamente y el pellet obtenido se resuspendió en 500 μ l de solución de transformación 2 (ST2) [AII]. La suspensión obtenida se incubó durante 20 minutos en hielo, se centrifugó 5 min a 5000 rpm y el pellet se resuspendió en 100 μ l de ST2. Se agregaron 5 μ l de mezcla de ligación correspondiente a cada uno de los insertos y se incubó 1 h en hielo y luego se llevó rápidamente a un baño a 42°C por 45 s. Se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubaron las bacterias transformadas a 37°C con agitación durante 1 h. Finalmente, las células se centrifugaron a 4.200 rpm por 5min, se resuspendieron en 50 μ l de medio LB y se sembraron en placas de Petri con LB agar [AII] suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Para identificar los clones positivos que contenían los insertos de interés, se procedió a inducir la expresión de Atox, Clf40, FnBPD1-3, IsdHD1-2 [III-2-3-1] y posteriormente se compararon los pesos moleculares de los productos expresados mediante un SDS-PAGE. A los clones que expresaron productos del peso molecular esperado, se les hizo una minipreparación de ADN plasmídico [III-3-2-3] y se enviaron a secuenciar con los oligonucleótidos *T7 promoter* y *T7 terminator* (C.I.C.V.yA. INTA-Castelar, Bs. As), para corroborar la identidad de los clones obtenidos. Los resultados de las secuenciaciones se analizaron con el programa “Standard Nucleotide BLAST” disponible en internet (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

III-2-3. Producción de las proteínas recombinantes

III-2-3-1. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes

De los clones positivos obtenidos en la transformación anterior, se seleccionó uno para cada proteína, en base a mayores niveles de expresión, y menor número de mutaciones a nivel de los pares de bases respecto de la secuencia utilizada para el diseño de los oligonucleótidos cebadores. Dichos clones, y el clon que expresa la Btox ya disponible en el laboratorio, se cultivaron en 5 ml de medio líquido LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina, y se dejaron crecer durante toda la noche en agitación a 37°C. Una alícuota de este cultivo fue diluído 100 veces en 300 ml del mismo medio e incubado en iguales condiciones hasta alcanzar una DO_{600} = 0,5 – 0,6. Para la inducción de la expresión de las

proteínas recombinantes se agregó 7,5 mM de lactosa, y se continuó incubando a temperatura ambiente 16 h. Luego, se recogieron las células centrifugando 10 min a 10.000 rpm, se resuspendieron en H₂O_d. Para proteger los productos de expresión, se incorporaron inhibidores de proteasas previamente al paso de sonicado: PMSF (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*, Sigma) y EGTA (del inglés *ethylene glycol tetraacetic acid*, Sigma) a concentración final 1 mM. La suspensión se sonicó mediante pulsos de 1 min a 60% de potencia (Vibracell, Sonics and Materials inc, Danbury, Connecticut, USA), se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C y se conservó el sobrenadante.

III-2-3-2. Purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de las proteínas se llevó a cabo por cromatografía de pseudoafinidad a níquel (Ni Sepharose High Performance, Life Sciences, GE) [All]. Las muestras sonicadas, se acondicionaron con solución de siembra (SS), para su posterior pasaje por la columna. La columna se empacó con 3 ml de matriz Ni-sefarosa, se lavó con 10 volúmenes de solución de siembra (SS) y se ajustó el flujo a 8 gotas/min. Luego se pasaron las muestras, recirculando 2 veces. Se realizó nuevamente un lavado con 10 volúmenes de SS y se procedió a la elución de las proteínas adheridas a la columna con distintas soluciones de elución (SE). Se empleó un gradiente de imidazol en concentraciones 50Mm (SE1), 100Mm (SE2), 250mM (SE3) y 500Mm (SE4). Se hicieron circular 6 volúmenes de cada solución, recolectándose fracciones de 1 ml. Por último se realizó un lavado final de la columna con SS y se conservó la columna en etanol al 20%.

La Btox se purificó también por cromatografía de pseudoafinidad a níquel, pero en condiciones desnaturizantes, con una renaturalización *in situ* siguiendo instrucciones del fabricante de la columna (Amersham Biosciences, *Rapid and efficient purification and refolding of a (His) 6-tagged recombinant protein produced in E. coli as inclusion bodies*) [All]. La solución de proteína sonicada se acondicionó en solución de siembra desnaturizante, conteniendo urea 4M (SSD). Luego de pasar 2 veces la muestra por la columna, y hacer el lavado con 10 vol de SSD, se hizo un paso de renaturalización de la proteína para lo cual se hicieron circular 5 ml de soluciones de renaturalización, con concentraciones decrecientes de urea (SR1, SR2, SR3 y SR4). Finalmente se eluyó la proteína con un gradiente de imidazol juntando fracciones de 1 ml para cada solución de elución (SEdr1, SEdr2, SEdr3 y SEdr4).

III-2-3-3. Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas

La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE al 15%, seguida de tinción con azul de Coomassie [II-2-2-1 y All]. Las proteínas purificadas se dializaron contra buffer MOPS [All] y se cuantificaron por una técnica fluorométrica según instrucciones del fabricante (Qubit® Protein Assay Kit, Invitrogen).

Para simplificar la denominación de las proteínas recombinantes obtenidas se hace referencia a cada una de ellas como: rAtox, rBtox, rClf, rFnBP y rIsdH.

III-2-4. Evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes

III-2-4-1. Inmunización de ratones y toma de muestras

Para evaluar la capacidad de los fragmentos recombinantes de generar anticuerpos específicos, se inmunizaron ratones hembras Balb/c de entre 6-8 semanas de edad, mantenidos con alimento y agua *ad libitum*, y períodos de luz/oscuridad de 12 h. Se trabajó con 3 grupos por molécula recombinante, de 6 animales cada uno, en los cuales se probaron 2 dosis de cada proteína y se inoculó un grupo control con PBS 1x [AII]. Todos los grupos recibieron AIF formulado al 50% con las soluciones de proteína o PBS 1x, según corresponda. En la tabla 8 se muestra el detalle de las formulaciones. Se administraron 3 dosis, a los 0, 10 y 20 días, tomando muestras de sueros preinmune (día 0) y a los 7 días de la última inmunización (a los 27 días).

Tabla 8. Denominación de los grupos inmunizados y formulación de los inmunógenos.

| Inmunógeno | Denominación del grupo | Formulación del inmunógeno |
|--------------|------------------------|----------------------------|
| rClf | rClf2 | 2µg de rClf + AIF |
| | rClf20 | 20µg de rClf + AIF |
| | PBS | PBS + AIF |
| rFnBP | rFnBP2 | 2µg de rFnBP+ AIF |
| | rFnBP20 | 20µg de rFnBP+ AIF |
| | PBS | PBS + AIF |
| rBtox | rBtox2 | 2µg de rBtox+ AIF |
| | rBtox20 | 20µg de rBtox+ AIF |
| | PBS | PBS + AIF |
| rIsdH | rIsdH2 | 2µg de rIsdH+ AIF |
| | rIsdH20 | 20µg de rIsdH+ AIF |
| | PBS | PBS + AIF |

III-2-4-2. Medición de anticuerpos mediante ensayos de ELISA

Para determinar los niveles de IgG_{total} inducidos por la inmunización con las proteínas recombinantes, se realizaron ensayos de ELISA indirectos siguiendo el protocolo general detallado en el capítulo II [(II-3-2-

3]. En este caso se sensibilizaron las placas con 1 µg de rBtox, rClf, rFnBP, ó rIsdH, según corresponda, diluïdos en buffer carbonato [AII]. Los sueros se utilizaron en una dilución 1/200 y el conjugado anti-IgG_{total} de ratón se diluyó 1/10.000.

Para determinar diferencias significativas entre las medias de los títulos de los distintos grupos, se aplicó el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn para comparaciones múltiples ($p < 0,05$).

III-2-5. Análisis de la especificidad de los anticuerpos mediante ensayos de Western blot

III-2-5-1. Obtención de la nBtox

Selección de una cepa de *S. aureus* productora de Btox

Se evaluó la producción de la Atox, Btox y toxinas delta (δ -toxina) en 10 cepas de *S. aureus* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología del Área de Investigación en Producción Animal (A.I.P.A.) de la EEA Rafaela. Se prepararon placas con Agar Base suplementado con 5 % de glóbulos rojos (GR) de carnero, previamente lavados 3 veces con solución salina estéril. Se sembraron a lo largo de la placa 1 estría de la cepa *Corynebacterium pseudotuberculosis* NCTC 3450 y 1 de la cepa *Streptococcus agalactiae* ATCC 27956 y se incubó por 24 horas a 37 °C en atmósfera con 10% CO₂.

Luego de la incubación se sembraron las cepas de *S. aureus* a evaluar, así como la cepa de referencia Reynolds, en ángulo recto a las estrías previamente crecidas y se incubó nuevamente 24 horas a 37°C en atmósfera con 10% CO₂. *C. pseudotuberculosis* es capaz de producir sustancias que inhiben el efecto lítico de Atox y Btox de *S. aureus* pero no afectan la δ hemólisis. *Streptococcus agalactiae* produce sustancias que lisan los glóbulos rojos de carnero en presencia de Btox de *S. aureus* [Calvinho y Dodd, 1994]. La cepa seleccionada corresponde a la 226 del cepario de A.I.P.A, INTA.

Extracción de la nBtox

A partir de la cepa 226 previamente seleccionada, se purificó la nBtox de *S. aureus*. La cepa se cultivó en CTS a 37°C durante toda la noche. Cinco ml de dicho cultivo se agregaron a 100 ml de CTS fresco, incubando durante 7 h a 37°C en agitación. Transcurrido dicho tiempo se centrifugó a 16.000 g durante 40 min a 10°C. Se descartó el pellet y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0,22 µm para eliminar restos de bacterias enteras. Se agregó sulfato de amonio hasta 80% de saturación (56 g/100ml), con agitación hasta disolución completa y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó nuevamente a 16.000 g durante 40 min a 10°C y el pellet obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de sulfato de amonio a 80% de saturación. Se centrifugó a 27.000 g durante 15 min a 10°C y se resuspendió el pellet en mínimo volumen de PBS. Finalmente se dializó contra 50 volúmenes de PBS durante 24 h. El

producto se conservó a -20°C hasta su utilización. El extracto proteico obtenido se evaluó por SDS-PAGE al 15%, seguido de tinción con azul de Coomasie.

III-2-5-2. Tratamiento de las proteínas recombinantes con enteroquinasa

Para desprender la trx que se expresa fusionada a las proteínas recombinantes, se realizó un tratamiento con enteroquinasa. Primero 1 mg de las proteínas se dializaron contra solución para Enteroquinasa [AII]. Luego se agregaron 5 U de enzima/50 µg de proteína de fusión y se incubó a temperatura ambiente durante 18 h.

III-2-5-3. Obtención de un extracto de *E. coli*

Se recuperaron células a partir de 200 ml de un cultivo O.N de *E. coli*, y el pellet se resuspendió en 40 µl de agua destilada y 40 µl solución de siembra para SDS-PAGE.

III-2-5-4. Ensayo de Western Blot

Los ensayos de Western blot se llevaron a cabo a fin de comprobar la especificidad de los sueros de ratón obtenidos con las proteínas recombinantes. Se empleó la metodología descrita en el capítulo II [II-2-2-2], pero utilizando como muestras las proteínas recombinantes obtenidas: rIsdH, rFnBP, rClf y rBtox; las mismas proteínas luego del tratamiento enteroquinasa [III-2-5-2], la nBtox [III-2-5-1] y el extracto de *E. coli* [III-2-5-3]. Las membranas se enfrentaron a una dilución 1/100 de un pool de sueros provenientes de los grupos de animales rIsdH2, rFnBP2, rClf2, rBtox2, y PBS.

III-3. RESULTADOS

III-3-1. Obtención de las secuencias codificantes para Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2.

Las secuencias correspondientes a Atox, Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2 se obtuvieron mediante PCR, empleando como molde ADN genómico purificado a partir de la cepa de referencia Reynolds de *S. aureus*. Para esto se diseñaron oligonucleótidos cebadores a partir de las siguientes secuencias pertenecientes a la base de datos Genbank: BX571857.1, Z18852, AJ629121.1 y AP009351.1, correspondientes a las proteínas Atox, ClfA, FnBPA e IsdH, respectivamente. Cada reacción de PCR dio como resultado un único producto de amplificación, del tamaño esperado según el cálculo teórico: Clf40= 1569pb, FnBPD1-3= 409 pb, IsdHN1-2= 1186 pb y Atox= 854 pb [AI-5-1, AI-6-1, AI-7-1, AI-8-1]. Por lo tanto, se puede decir que los oligonucleótidos fabricados permitieron obtener con éxito los fragmentos de interés y de manera altamente específica [Figura 19].

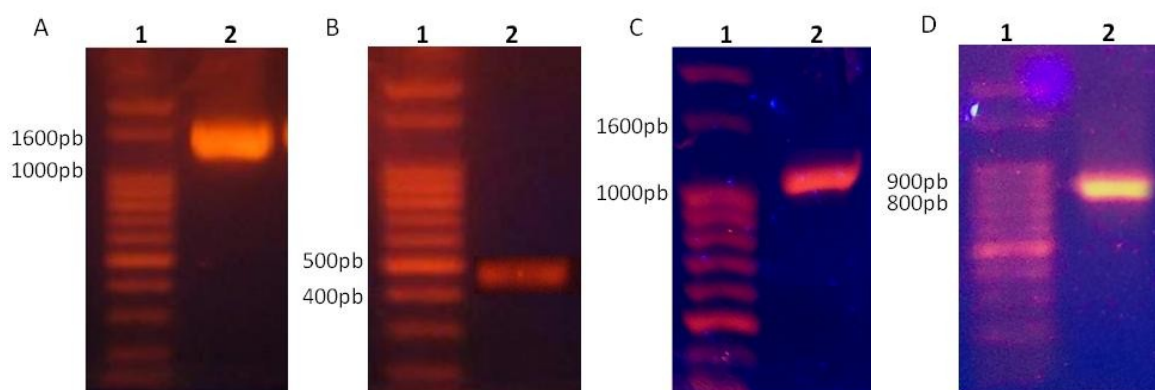


Figura 19. Obtención de los fragmentos Clf40, FnBPD1-3, IsdHN1-2 y Atox de *S. aureus*. Las secuencias se amplificaron mediante reacción de PCR, a partir de la cepa Reynolds de *S. aureus*. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Calles 1: MPM de 400pb, calles 2: productos de PCR correspondientes a las secuencias codificantes para Clf40 (A), FnBPD1-3 (B), IsdHN1-2 (C) y Atox (D). Se indican los tamaños de las bandas del marcador más cercanas al tamaño de los fragmentos amplificados.

Los fragmentos obtenidos se subclonaron en el vector pGEM T-easy y se transformaron células de *E. coli* (DH5- α). Para identificar los clones positivos que contenían el vector con el inserto, se llevaron a cabo reacciones de PCR de colonias. Aquellas que dieron productos de amplificación de los tamaños correspondientes, se enviaron a secuenciar para estudiar y corroborar la identidad de los fragmentos recombinantes. Las secuencias obtenidas se alinearon con la colección de secuencias nucleotídicas de *S. aureus*, taxid: 1280 de la base de datos Genbank, empleando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®). Los alineamientos para Clf40 dieron porcentajes de identidad entre 99 y 100% con más

de 30 secuencias indexadas, las cuales en su mayoría estaban descritas como *clumping factor A*, ó proteína de unión a fibrinógeno [AI-5-2]. La secuencia de IsdHD1-2, alineó con un 99-100% de identidad con la mayoría de las secuencias indexadas, todas identificadas como proteínas asociadas al transporte de hierro [AI-7-2]. En el caso de la Atox, se obtuvo un 99% de similitud con más de 50 secuencias de la base de datos, descrita como genes de alfa hemolisina ó asociada al genoma completo de *S. aureus* [AI-8-2]. Por último, el fragmento FnBPD1-3, presentó menores porcentajes de identidad (94-95%) con la mayoría de las secuencias. Sin embargo, la secuencia era específica y sólo alineó con proteínas de unión a fibronectina [AI-6-2]. Los resultados obtenidos comprobaron el éxito del clonado de los fragmentos en el vector pGEM T-easy. Se seleccionó un clon por proteína para continuar trabajando.

Se procedió al clonado de los fragmentos en el vector de expresión pET32-a. Las colonias obtenidas de la transformación se chequearon mediante inducción de la expresión de los insertos y análisis en geles de poliacrilamida. En la figura 20 se muestran, a modo de ejemplo, las corridas electroforéticas correspondientes a un clon de cada proteína. Se obtuvieron clones positivos para rClf40, rFnBPD1-3 e IsdHN1-2; mientras que no se logró expresión de la ATox. Los pesos moleculares resultaron los esperados: rClf40 91 KDa (78 KDa del fragmento + 21 KDa de la Trx), rFnBPD1-3 de 65,5 KDa (44,5 KDa de fragmento + 21 KDa de Trx), rIsdHN1-2 de 85,5 KDa (64,5 KDa de fragmento + 21 KDa de Trx).

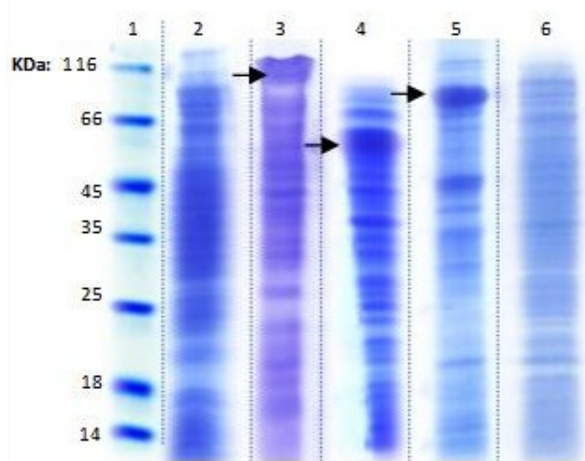


Figura 20. Expresión de las proteínas recombinantes. SDS-PAGE al 15%, teñido con Coomassie blue. **Calle 1:** MPM, **calle 2:** control de inducción (*E. coli* transformado con el vector pET32a vacío), **calle 3:** inducción del clon Clf40, **calle 4:** inducción del clon FnBPD1-3, **calle 5:** inducción del clon IsdHN1-2, **calle 6:** inducción del clon Atox. Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas de interés.

III-3-2. Producción de las proteínas recombinantes

III-3-2-1. Producción de rClf, rFnBP e rIsdH.

Los clones obtenidos anteriormente, capaces de expresar de manera recombinante los fragmentos Clf40, FnBPD1-3 e IsdHN1-2, se utilizaron para producir las proteínas en cantidad necesaria para la

posterior evaluación de las mismas como inmunógenos. De aquí en adelante las proteínas expresadas se denominan rClf, rFnBP e rIsdH, para simplificar la denominación.

Se indujo la expresión de las proteínas a partir de los clones obtenidos y se purificaron por cromatografía de pseudoafinidad a níquel, tomando muestras durante las eluciones con las distintas soluciones de imidazol (SE1, SE2, SE3y SE4) [Figura 21, Figura 22, Figura 23]. Se lograron purificar eficientemente las tres proteínas de interés. Como se puede ver en las imágenes, las muestras de elución presentaron diferentes niveles de pureza; por lo tanto, para cada proteína, se seleccionaron y mezclaron las fracciones de mejor calidad. Dichas mezclas se utilizaron para los posteriores ensayos de inmunización de animales.

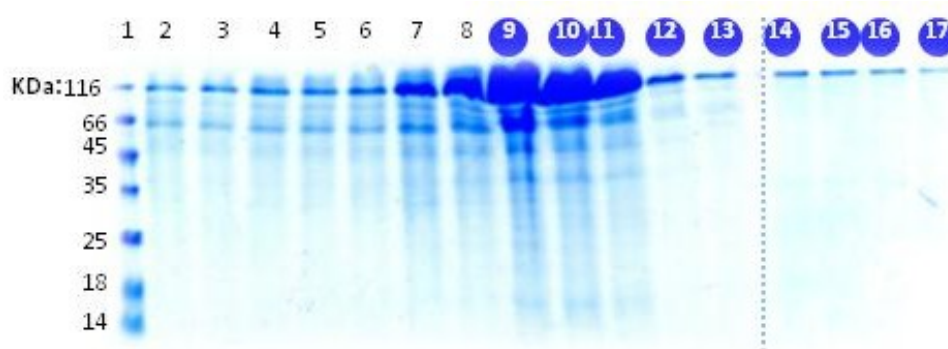


Figura 21. Purificación de rClf por cromatografía de pseudoafinidad a Níquel. SDS-PAGE al 15%, teñido con Coomasie blue. **Calle 1:** MPM, **calles 2-5:** fracciones eluidas con SE1, **calles 5-8:** fracciones eluidas con SE2, **calles 9-12:** fracciones eluidas con SE3, **calles 13-17:** fracciones eluidas con SE4. Se muestran englobadas en círculos azules las fracciones seleccionadas por su pureza.

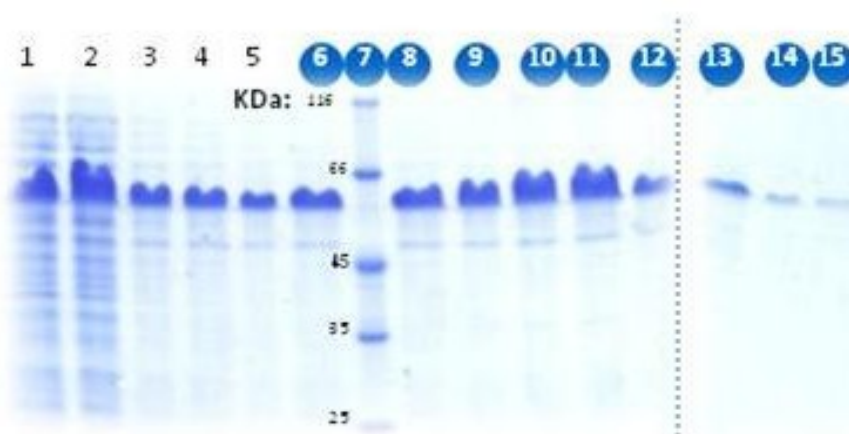


Figura 22. Purificación de rFnBP por cromatografía de pseudoafinidad a Níquel. SDS-PAGE al 15%, teñido con Coomasie blue. **Calle 1-2:** fracciones eluidas con SE1, **calles 3-6:** fracciones eluidas con SE2, **calle 7:** MPM, **calles 8-12:** fracciones eluidas con SE3, **calles 13-15:** fracciones eluidas con SE4. Se muestran remarcadas las fracciones seleccionadas por su pureza.

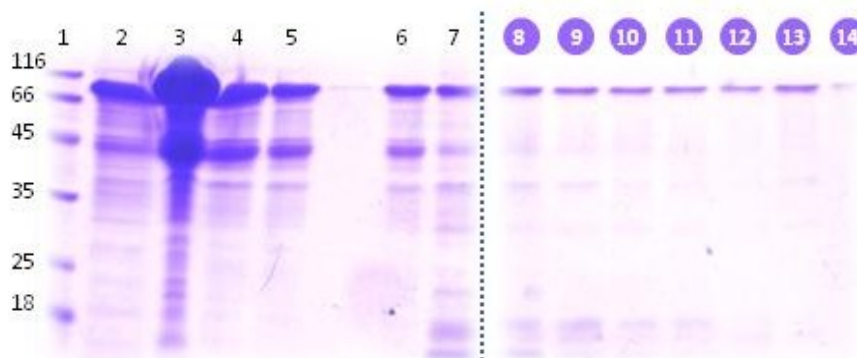


Figura 23. Purificación de rIldH por cromatografía de pseudoafinidad a Níquel. SDS-PAGE al 15%, teñido con Coomassie. **Calle 1:** MPM, **calles 2-4:** fracciones eluidas con SE1, **calle 5-7:** fracciones eluidas con SE2, **calles 8-11:** fracciones eluidas con SE3, **calles 12-14:** fracciones eluidas con SE4. Se muestran remarcadas las fracciones seleccionadas por su pureza.

III-3-2-2. Producción de rBtox

La expresión de la proteína rBtox a partir del clon disponible en el laboratorio, se llevó a cabo de la misma manera que lo descrito para las proteínas obtenidas anteriormente [Figura 24]. El peso molecular de la rBtox fue de 55KDa, correspondiendo 33KDa a la hemolisina y 21 KDa a la Trx. Para la purificación, fue necesario aplicar un protocolo alternativo de cromatografía de pseudoafinidad a níquel, empleando condiciones desnaturalizantes. En la figura 25 se muestran los resultados de la purificación. Las fracciones que se muestran remarcadas en un círculo azul, son las que se seleccionaron para mezclar y continuar trabajando en los ensayos de evaluación de la inmunogenicidad de la proteína. El análisis del SDS-PAGE, demuestra que no quedaron cantidades significativas de rBtox sin adherirse a la matriz de la columna [Figura 25, calle 2] y que no hay desprendimiento de la proteína durante la etapa de renaturalización [Figura 25, calles 3-7]. Por lo tanto, el protocolo empleado fue eficiente para obtener la rBtox purificada.

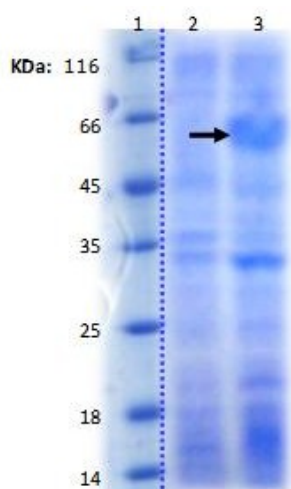


Figura 24. Expresión de la proteína rBtox. SDS-PAGE al 15%, teñido con Coomassie blue. **Calle 1:** MPM, **calle 2:** control de inducción (*E. coli* transformado con el vector pET32a sin inserto, sin inducir), **calle 3:** inducción de rBtox.

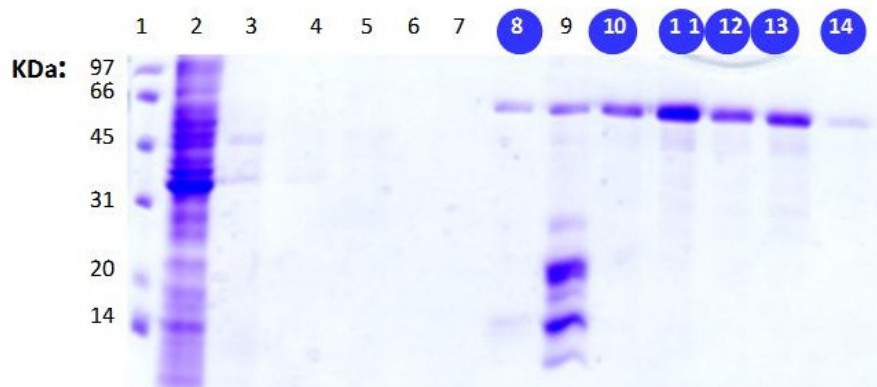


Figura 25. Purificación de rBtox por cromatografía de pseudoafinidad a Níquel. SDS-PAGE al 15%, teñido con Coomassie blue. **Calle 1:** MPM, **calle 2:** muestra de lo que no se pega a la columna, **calle 3-7:** fracciones correspondientes a la etapa de re-naturalización, eluidas con SR1-4, respectivamente; **calle 8-9:** fracciones eluidas con SEdr1, **calles 10-11:** fracciones eluidas con SEdr2, **calles 12-14:** fracciones eluidas con SEdr3. Se muestran remarcadas las fracciones seleccionadas por su pureza.

III-3-2-3. Caracterización de las proteínas recombinantes obtenidas

Como se mencionó anteriormente, para cada proteína se mezclaron las fracciones más puras obtenidas de la purificación, se dializaron contra una solución amortiguadora y se corrieron nuevamente en geles de poliacrilamida para corroborar el estado final de las muestras. Se puede observar en la figura 26, que si bien aparecen otras bandas de menor peso molecular, éstas son minoritarias y las fracciones están enriquecidas en las proteínas rBtox, rClf, rFnBP y rIsdH de interés. La concentración de proteínas y rendimiento de las purificaciones se muestran en la tabla 9.

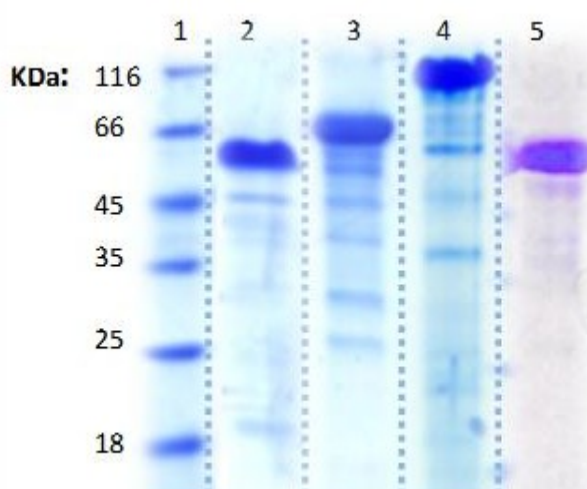


Figura 26. Caracterización electroforética de las proteínas recombinantes purificadas. SDS-PAGE al 15% teñido con Coomassie blue. **Calle 1:** MPM, **calle 2:** rFnBP, **calle 3:** rIsdH, **calle 4:** rClf, **calle 5:** rBtox.

Tabla 9. Determinación de la concentración de proteínas y rendimiento de la producción de rClf, rFnBP, rIsdH y rBtox

| Proteína | Concentración (mg/ml) | Volúmen (ml) | Total de proteína (mg) | Y* (mg _{prot} /L _{cultivo}) |
|----------|-----------------------|--------------|------------------------|--|
| rBtox | 0,48 | 32 | 6,40 | 11,4 ± 0,36 |
| rFnBP | 0,36 | 44 | 15,84 | 21,5 ± 0,32 |
| rIsdH | 0,57 | 34 | 19,57 | 18,6 ± 0,39 |
| rClf | 0,51 | 18 | 9,18 | 17,2 ± 0,86 |

*Es el promedio de los rendimientos obtenidos en los distintos lotes de producción, se expresa acompañado de la desviación estándar (Y ± DE).

III-3.3. Evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas obtenidas

III-3-3-1. Medición de anticuerpos mediante ensayos de ELISA.

Para evaluar el desempeño de rBtox, rClf, rFnBP y rIsdH como inmunógenos, se inmunizaron ratones con una dosis baja (2 µg) y dosis alta (20 µg) de las proteínas recombinantes. Al comparar los títulos de IgG_{total} obtenidos con ambas dosis, no se detectaron diferencias significativas para rClf, rFnBP o rIsdH. En cambio, la administración de 20 µg de rBtox generó títulos significativamente superiores a la menor dosis ($p < 0,05$). Sin embargo, para todas las proteínas recombinantes, las dos dosis probadas generaron altos niveles de anticuerpos, muy superiores a los respectivos grupos control ($p < 0,01$) [Figura 27].

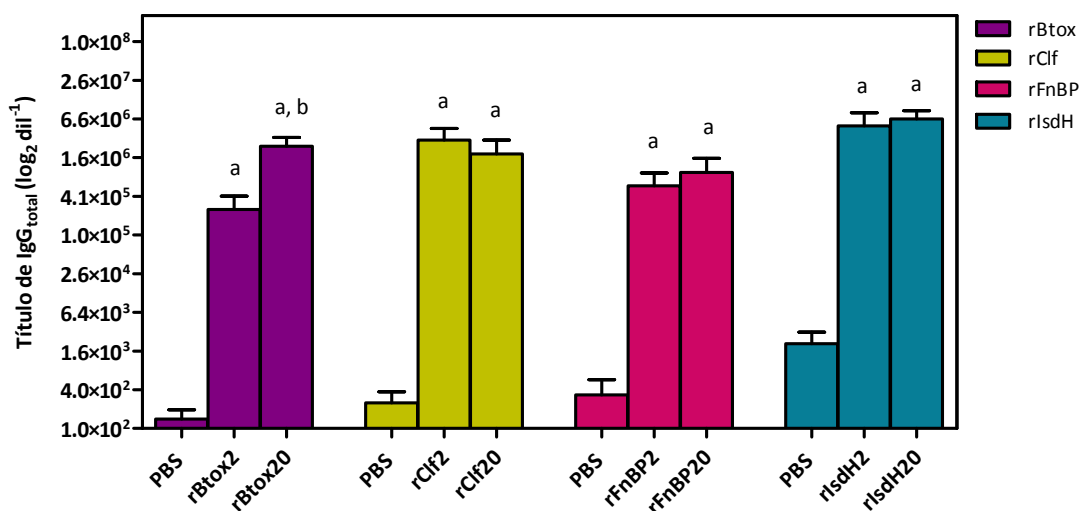


Figura 27. Niveles de IgG_{total} inducidos por inmunización de diferentes dosis de rBtox, rClf, rFnBP o rIsdH. Se inmunizaron ratones hembras CF1 con 2 µg y 20 µg de cada proteína (rBtox, rClf, rFnBP o rIsdH) a los 0, 10 y 20 días.

Se evaluaron los niveles de IgG_{total} en muestras de suero tomadas a los 27 días post inmunización mediante ensayos de ELISA. Se muestran las medias y la DS para cada grupo de animales. ^ay ^b Diferencias significativas respecto del grupo control (Mann Whitney, $p < 0,01$) y del grupo rBtox2, respectivamente (Mann Whitney, $p < 0,05$).

II-3-3-2. Análisis de la especificidad de los anticuerpos mediante ensayos de Western Blot

Debido a que las proteínas recombinantes fueron producidas fusionadas a la *trx*, se realizaron ensayos de Western blot con el fin de verificar la especificidad de los sueros obtenidos. Para esto se enfrentaron las proteínas recombinantes a los sueros específicos correspondientes a los grupos de animales inmunizados con la dosis proteica de 2 μ g. Se incluyeron muestras de las proteínas cortadas con enteroquinasa (la cual remueve la *trx*), un extracto de *E. coli* y la proteína Btox nativa (nBtox) purificada a partir de una cepa productora [AI-3].

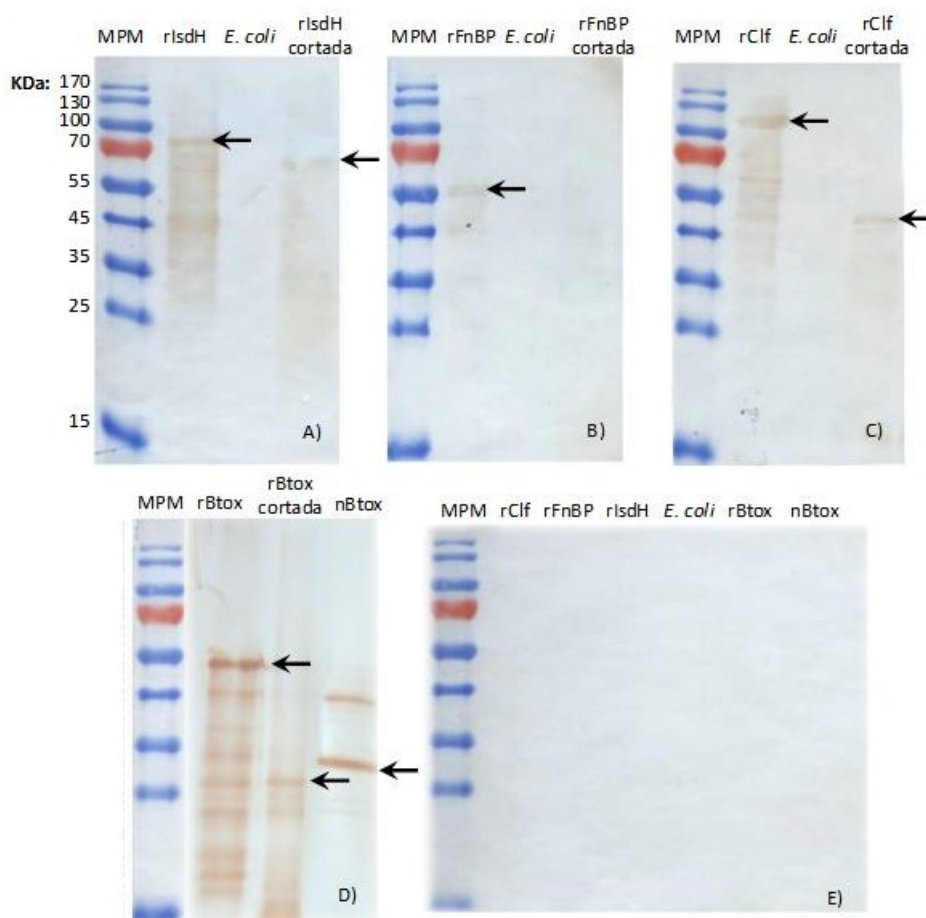


Figura 28. Ensayos de especificidad de los sueros. Se realizaron ensayos de Western blot donde se enfrentaron los sueros de ratones correspondientes a los grupos inmunizados con 2 μ g de las proteínas recombinantes rIldH (A), rFnBP (B), rClf (C), rBtox (D) y sueros control (E) a las respectivas proteínas recombinantes. Además se incluyeron como controles de la especificidad de dichos sueros, muestras provenientes de los cortes de las proteínas con enteroquinasa, la Btox purificada a partir de una cepa productora (nBtox) y un extracto de *E. coli*. Se indican con una flecha las bandas específicas.

Como puede observarse en la figura 28, los sueros identificaron a las proteínas recombinantes dando revelado de bandas del tamaño correspondiente a cada proteína, mientras que no hubo reconocimiento de productos en los extractos de *E. coli*. A su vez, la eliminación de la proteína de fusión *Trx*, no afectó

el reconocimiento por parte de los sueros, demostrando que los anticuerpos presentes estaban dirigidos contra las proteínas de interés. Con respecto a la rFnBP, el tratamiento con la proteasa produjo un degradado completo de la proteína, lo cual se tradujo en una falta de reconocimiento por parte de los sueros anti-rFnBP. Dada la facilidad para la extracción de la nBtox a partir de las cepas productoras, fue posible incluirla en este inmunoensayo. Los anticuerpos anti-rBtox, fueron capaces de reconocer a la nBtox con la misma eficiencia que a la rBtox, contra la cual estaban dirigidos.

III-4. DISCUSIÓN

En este capítulo se trabajó en la obtención de antígenos recombinantes provenientes de *S. aureus*, y la evaluación de los mismos como inmunógenos, para sustentar su incorporación en una posterior formulación multicomponente.

Los fragmentos producidos correspondientes a rClf, rFnBP y rIsdH comprenden los sitios de unión de dichas moléculas a sus ligandos. Se seleccionaron estas secuencias, con el objetivo de dirigir la respuesta inmune a bloquear directamente las funciones de las proteínas. Además, al estar implicadas en la función de las moléculas, estos dominios son secuencias muy conservadas [Sitbon y Pietrokovski, 2007]. La utilización de secuencias conservadas como inmunógenos contribuye a contrarrestar los mecanismos de evasión del patógeno, basados en la variación de epitopes de superficie, y a redirigir la respuesta inmune hacia epitopes inmunoprotectivos, que de otra manera son inmuno-recesivos o se mantienen enmascarados durante las infecciones naturales [Delany y col., 2013; Nabel, 2013]. También se tuvieron en cuenta los antecedentes bibliográficos, en los que evaluaban tanto la inmunogenicidad como el nivel de protección que ofrecían los antígenos en distintos modelos animales de infección. En el presente trabajo se eligió el fragmento ClfA40 correspondiente a la región A de unión a Fg de ClfA, empleado en la mayoría de los trabajos en los que estudian a ClfA como candidato vacunal. Los distintos estudios demuestran que los anticuerpos generados contra ClfA40 contribuyen a aumentar la fagocitosis de la bacteria, a disminuir la adherencia a Fg y a reducir la virulencia de la bacteria en un modelo murino de mastitis [Brouillette y col., 2002]. Además, se ha reportado que la inmunización de murinos con ClfA40 ofrece protección frente a las infecciones por *S. aureus*, reduciendo la carga bacteriana y disminuyendo los daños ocasionados por el patógeno [Gong y col., 2010]. En relación a FnBP, existe cierta discordancia respecto a la secuencia a emplear, ya que algunos trabajos reportaron que la unión de los anticuerpos dirigidos contra los sitios de unión a Fn (D1, D2 ó D3), contribuirían a estabilizar el complejo proteína-ligando y no a bloquear dicha interacción [Casolini y col., 1998; Foster y Hook, 1998]. Esto desencadenó el estudio y desarrollo de distintos péptidos sintéticos conteniendo secuencias externas a los sitios de unión a Fn y la evaluación de los mismos como inmunógenos. Si bien estos trabajos constituyen avances en cuanto al conocimiento funcional de los motivos D, no aportaron nuevos candidatos, ya que los resultados obtenidos al inmunizar con dichos péptidos son comparables o inferiores a los logrados al emplear los D1-3 completos. Se han reportado porcentajes de inhibición de la adherencia de entre un 30 y 70% para los anticuerpos anti-péptidos sintéticos [Sun y col., 1997; Huesca y col., 2000] comparado con el 70% para los anticuerpos dirigidos contra los dominios de unión [Schennings y col., 1993]. Además, los trabajos en los que utilizan D1-3, constituyen estudios más completos, en los que demuestran que la secuencia es capaz de generar buenos títulos de anticuerpos, así como de bloquear

la unión de la bacteria a la Fn, favorecer la fagocitosis y ofrecer protección en modelos murinos de infección por *S. aureus* [Schennings y col., 1993; Zhou y col., 2006]. Por lo tanto, se eligió utilizar el fragmento de unión completo para el presente trabajo. Hay pocos antecedentes en el uso de la proteína IsdH de *S. aureus* como inmunógeno, y los distintos trabajos emplean secuencias diferentes; sin embargo en todos los casos se demostró el potencial de la IsdH como candidato vacunal. Para seguir el mismo criterio aplicado para las proteínas anteriores, se seleccionó la secuencia correspondiente a los dominios de unión a hierro N1 y N2, para bloquear directamente la interacción con la Hb o complejo Hb-Hp e impedir la captación del hierro [Pilpa y col., 2006; Watanabe y col., 2008]. En un trabajo previo, Ster y col. (2010), probaron el dominio de unión a hierro N1 de la IsdH como potencial inmunógeno contra la mastitis bovina. Los anticuerpos generados contra IsdH fueron capaces de neutralizar la bacteria, reducir la virulencia bacteriana y prevenir el desarrollo de la infección por *S. aureus* en un modelo murino de mastitis. Respecto a Btox, el clon codificante para la secuencia completa se encontraba disponible con anterioridad en el laboratorio. Si bien no hay antecedentes en el uso de Btox recombinantes como inmunógeno, estaba reportado el potencial inmunogénico de otras toxinas de *S. aureus* al emplear sus secuencias completas. Se ha demostrado que los anticuerpos anti-Atox, son eficientes en neutralizar la actividad hemolítica de la proteína [Pozzi y col., 2012]. Interesantemente, la inmunización de animales con la secuencia completa de Atox, genera entre 90-100% de protección frente a desafíos con distintas cepas virulentas de *S. aureus* en modelos murinos de neumonía y sepsis [Bubeck Wardenburg y Schneewind, 2008]. Según estos antecedentes, se decidió trabajar con la proteína Btox completa ya disponible.

La estrategia de clonado empleada permitió obtener con éxito los fragmentos proteicos de interés. La comparación de las secuencias clonadas con la base de datos Genbank, arrojó altos porcentajes de identidad con las respectivas secuencias indexadas provenientes de distintas cepas de *S. aureus*, comprobando la conservación de las secuencias seleccionadas. Por su parte la rFnBP, alineó tanto con secuencias identificadas como *fnbp a* o como *fnbp b*. Esto se debe a que se clonó el sitio de unión a la Fn, el cual presenta una alta identidad entre las dos formas de la proteína [Brouillette y col., 2003b]. Esto es ventajoso en el desarrollo de una vacuna, ya que permitiría generar inmunidad contra un mayor número de cepas de *S. aureus*, independientemente de que sean productoras de FnBPA o FnBPB. Las proteínas rClf, rFnBPA, rIsdH y rBtox se expresaron adecuadamente, mientras que a pesar de que se obtuvieron clones positivos conteniendo el fragmento de Atox, no se logró la expresión de dicha proteína. Cabe destacar que se realizaron pruebas bajo diferentes condiciones de inducción, variando tiempos, temperaturas, agente inductor y cepas de transformación (*E. coli* BL-21, *E. coli* Rosetta y *E. coli* Tuner), sin lograr la expresión exitosa de la proteína. Estas dificultades, llevaron a descartar la utilización de Atox de este trabajo.

La metodología de purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de pseudoafinidad a níquel, fue utilizada por otros autores para el desarrollo de vacunas a subunidades recombinantes [Rubio y col., 2009; Costa y col., 2013]. En el presente trabajo, la metodología permitió purificar las proteínas rClf, rFnBP y rIldH, mientras que para la obtención de la rBtox fue necesario realizar cambios en las condiciones de purificación. La rBtox eluía durante el pasaje de la muestra por la columna cromatográfica, lo cual sugería que el plegamiento de la proteína estaba enmascarando las colas de histidina, impidiendo que interaccionen con la matriz. Aplicando un protocolo de purificación en condiciones desnaturalizantes y posterior re-plegamiento *in situ* se logró el pegado eficiente de la rBtox a la columna y su purificación. En los ensayos de Westernblot, la ausencia de bandas en las calles correspondientes al extracto de *E. coli*, demuestra que no quedaron componentes bacterianos luego de la purificación y sugieren que las demás bandas observadas en los geles de poliacrilamida [Figura 26], podrían corresponder a productos de degradación de las proteínas. Por lo tanto, las estrategias de producción de proteínas permitieron obtener las proteínas rBtox, rClf, rFnBP y rIldH en calidad adecuada para su uso como inmunógenos. Además, los rendimientos resultaron altos, superiores a los 5- 12 mg/L reportados para la producción de proteínas recombinantes de otros microorganismos en la que utilizan la misma estrategia de clonado y purificación [Xiong y col., 2006; Piubelli y col., 2013]. No se pudo realizar esta comparación respecto a trabajos bibliográficos referidos a *S. aureus*, debido a que no suelen reportar este dato [Ciborowski y col., 1992; O'Connell y col., 1998; Kuklin y col., 2006; Arrecubieta y col., 2008; Bubeck Wardenburg y Schneewind, 2008; Gong y col., 2010; Ster y col., 2010; Pozzi y col., 2012]. Las proteínas se clonaron en el vector de expresión pET32-a, que expresa el inserto fusionado a la proteína Tiorredoxina (Trx). Trx, además de favorecer la solubilidad de las proteínas a las que se encuentra acoplada [Zhou y col., 2006], tiene propiedades inmunoestimulantes que mejoran la inmunogenicidad de las proteínas fusionadas [Rubio y col., 2009; Valiente-Gabioud y col., 2011]. Esto lo convierte en un vector apropiado para la expresión de proteínas destinadas a la formulación de vacunas. Las proteínas se evaluaron en ratones, administradas en dos dosis, una baja dosis (2 µg) y una alta dosis (20 µg), lo cual permitiría analizar la inmunogenicidad de las moléculas en función de la dosis y estimar las dosis individuales mínimas de cada proteína que se administrarán posteriormente en el modelo bovino de interés. Las proteínas rClf, rIldH y rFnBP generaron altos niveles de anticuerpos específicos respecto del control (inoculado con PBS), sin detectarse diferencias significativas entre los títulos alcanzados con las distintas dosis administradas. En el caso de la rBtox los niveles de anticuerpos resultaron significativamente mayor en los ratones inmunizados con 20 µg de proteína; sin embargo con la menor dosis el título obtenido fue del orden obtenido de 10^{-5} y 10^{-6} , similar al de las demás proteínas. Por lo tanto, no se detectó una gran variación de la respuesta de anticuerpos entre las dos dosis empleadas, lo cual ofrece ventajas económicas y en las estrategias de diseño, ya que permitiría utilizar

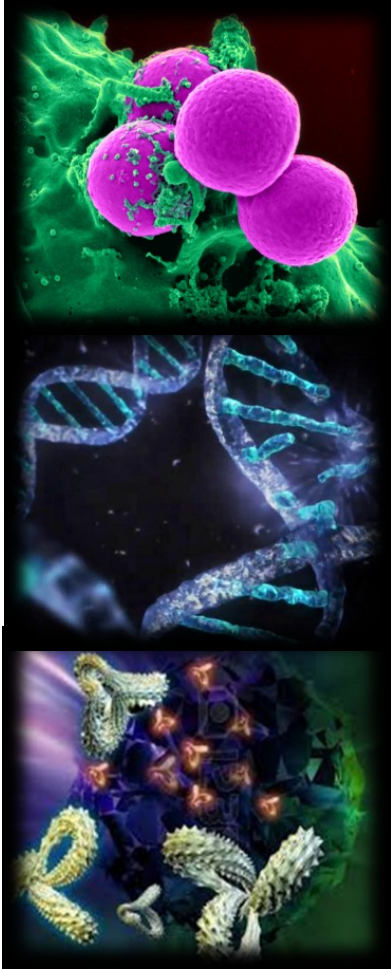
mínimas dosis de proteínas y formular un mayor número de antígenos en una formulación multicomponente.

Los niveles de anticuerpos obtenidos de la inmunización de ratones con las proteínas rClf, rFnBP, rIsdH y rBtox, fueron comparables o superiores respecto a los reportados en otros trabajos en los que emplean los mismos fragmentos proteicos. Por ejemplo, en un estudio en el que llevaron a cabo un protocolo de inmunización de ratones similar al del presente trabajo, administran 3 dosis de 40 µg de Clf40 (fragmento correspondiente a rClf del presente trabajo) a los días 0, 14 y 28, empleando adyuvante de Freund como inmunoestimulante [Gong y col., 2010]. Si bien el título promedio de IgG_{total} fue de $2,3 \times 10^{-5}$, y es comparable al aquí obtenido para los grupos rClf2 y rClf20, la dosis que aplicaron fue 20 y 2 veces más alta, respectivamente. Zhou y col. (2006) inmunizaron ratones con la misma construcción rFnBP aquí evaluada (fragmento D1-3 de la FnBPA fusionado a la Trx). Los autores aplicaron 3 dosis de 100 µg de proteína formulada con AIF, a los 0, 14 y 28 días y obtuvieron títulos de anticuerpos de 1×10^{-7} , sólo dos órdenes mayor al título promedio obtenido para rFnBP2 y rFnBP20 y con dosis superiores a las utilizadas en el presente trabajo [Zhou y col., 2006]. Respecto de IsdH, hay trabajos que reportan títulos del orden de 10^{-6} , al inmunizar conejos con el dominio de unión a hierro N1 de la IsdH [Ster y col., 2010]. Siendo que el modelo de conejo es el de preferencia para la producción de anticuerpos por los altos títulos que se logran, los resultados de este trabajo demuestran la buena inmunogenicidad de la proteína rIsdH producida. No hay antecedentes de la utilización de Btox recombinante como inmunógeno, sin embargo, el resultado es superior a los reportados para otras toxinas de *S. aureus*. Warderburg y Schneewind (2008) evaluaron un modelo murino de neumonía inmunizando ratones a los días 0 y 10 con 20 µg de una mutante de Atox (HlaH35L) sin capacidad de generar poros en membrana. El grupo inmunizado desarrolló un título promedio de anticuerpos de $5,6 \times 10^{-3}$, dos órdenes menor al obtenido en el presente trabajo con ambas dosis de la toxina.

Debido a que las proteínas estaban fusionadas a la Trx y los ensayos de ELISA se realizaron utilizando dichas construcciones como antígeno de sensibilización, se llevaron a cabo ensayos de Westernblot para verificar la especificidad de la respuesta humoral generada por los inmunógenos. La comparación de los patrones de reconocimiento obtenidos al enfrentar los sueros inmunes a las fracciones de proteína recombinante antes y luego del tratamiento con enteroquinasa, demostraron que los anticuerpos estaban dirigidos mayoritariamente contra los fragmentos correspondientes a las proteínas de interés. Por el contrario, no se observó reconocimiento de la Trx por parte de los sueros. Estos resultados comprueban que las proteínas recombinantes obtenidas, son altamente inmunogénicas y capaces de generar anticuerpos altamente específicos.

III-5. Conclusiones parciales

- Los fragmentos de interés correspondientes a las proteínas de *S. aureus* pueden ser de aplicabilidad en ensayos biológicos y en la producción de proteínas recombinantes teniendo en cuenta la calidad y el rendimiento de los mismos
- Las secuencias seleccionadas correspondientes a rBtox, rClf, rFnBP y rIsdH, resultan de utilidad para el desarrollo de inmunógenos multicomponentes basados en la combinación de múltiples antígenos y dosis proteicas limitadas, considerando que resultaron altamente inmunogénicas en murinos, incluso en bajas dosis.
- Las moléculas recombinantes obtenidas constituyen candidatos potenciales para la formulación de una vacuna multicomponente contra infecciones causadas por *S. aureus*.



Capítulo IV

**Evaluación de la respuesta
humoral generada en
vaquillonas por formulaciones
multicomponentes basadas en
antígenos de *S. aureus*.**

IV-I. INTRODUCCIÓN

Las IIM causadas por *S. aureus* son principalmente subclínicas, con altas probabilidades de volverse crónicas y altas tasas de diseminación a otros animales durante el ordeño [Middleton, 2008]. Por lo tanto, una vacuna realmente eficaz contra la mastitis bovina causada por *S. aureus* debería prevenir nuevas infecciones [Middleton, 2008]. El desarrollo de dicha vacuna constituye un verdadero desafío, debido no sólo a la complejidad de su patogenicidad, la cual envuelve múltiples factores de virulencia [Anderson y col., 2012], sino también por la naturaleza única de la inmunidad de la glándula mamaria [Denis y col., 2009]. A su vez hay una gran variedad de evaluación de vacunas experimentales contra *S. aureus* que difieren en cuanto a los criterios utilizados para interpretar los signos en los animales y para reportar los resultados [Mata, 2013]. Esto dificulta la reproducibilidad de los ensayos y lleva a discrepancias en los resultados impidiendo llegar a un consenso acerca de cuales protocolos inmunoterapéuticos son más protectivos ó más prometedores para continuar investigándolos [Pereira y col., 2011].

Desde hace décadas se está trabajando en la obtención de una vacuna eficaz contra las infecciones de la glándula mamaria causada por *S. aureus*. La mayoría de los desarrollos se orientaron a las vacunas tradicionales usando la bacteria inactivada, sólo o suplementada con otros antígenos purificados de *S. aureus*. Estos trabajos resultaron prometedores durante las etapas experimentales, pero no lograron superar las instancias de pruebas de eficacia a campo. Como se discutió previamente en el capítulo I, incluso las vacunas comerciales disponibles, como Lysigin™ (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc) y Startvac™ (HIPRA S.A), son vacunas tradicionales cuya eficiencia para prevenir nuevas IIM es controvertida [Middleton, 2008; Schukken y col., 2014].

Dada la falta de éxito de los desarrollos basados en bacterias enteras inactivadas, se comenzó a trabajar en nuevos tipos de vacunas. Hubo muchos intentos de generar vacunas a subunidades constituidas por factores de virulencia con roles claves en la patogénesis de *S. aureus*. Los polisacáridos capsulares se han empleado conjugados a proteínas transportadoras debido a su naturaleza T-independiente [O'Riordan y Lee, 2004; Lee y col., 2005]. Se los ha probado acoplados a albúmina [Gilbert y col., 1994; Tollersrud y col., 2001] ó a toxoides de *S. aureus* [Herbelin y col., 1997]. Los ensayos de inmunización de bovinos con estas vacunas conjugadas han demostrado ser inmunogénicos, induciendo la producción de anticuerpos IgG₂ (importante opsonina para PMN bovinos) [Gilbert y col., 1994], promoviendo el reclutamiento de neutrófilos activados a la glándula mamaria [Herbelin y col., 1997] y generando linfocitos de memoria capaces de proliferar frente al polisacárido un año después de la inmunización [Tollersrud y col., 2001]. A pesar de dichos resultados no se tienen evidencias acerca de la eficacia como inmunógenos protectivos.

Con los avances en el conocimiento de los mecanismos y factores de virulencia de *S. aureus*, y de la mano de la tecnología del ADN recombinante, se realizaron numerosos ensayos experimentales empleando adhesinas de la bacteria y enterotoxinas recombinantes, utilizando diferentes modelos animales. Pocos de dichos desarrollos fueron probados en vacas. Shkreta y col., utilizaron la estrategia de inmunización génica con vectores codificando para las proteínas FnBPA y ClfA de *S. aureus*, seguido de un refuerzo con las proteínas recombinantes [Shkreta y col., 2004]. Los resultados que obtuvieron fueron muy prometedores, ya que demostraron estimulación significativa tanto de una respuesta inmune humoral, así como mediada por células [Denis y col., 2009]. Otro estudio más recientemente evaluó la eficacia protectora de una vacuna, denominada MastaVacTM (LG Life Science Ltd.) [Chang y col., 2008], la cual está compuesta por la enterotoxina tipo C de *S. aureus*, obtenida de manera recombinante y mutada para eliminar su toxicidad. La inmunización de las vacas con MastaVacTM y el posterior desafío con cepas de *S. aureus* productoras de las enterotoxinas A, B, C y D, demostró proteger en un 100% de nuevas IIM, comparado con el 25% de incidencia en el grupo control [Chang y col., 2008]. Sin embargo, los resultados obtenidos en ese trabajo, fueron puestos en duda debido al bajo número de animales empleados (n=3), las diferencias estadísticas reportadas para algunos ensayos críticos (no reportados ó p=0,048), las cepas empleadas para el desafío (poco virulentas) y el tiempo de seguimiento del ensayo (13 días luego del desafío) [Middleton, 2008].

Algunos estudios lograron identificar potenciales antígenos vacunales de *S. aureus* aplicando enfoques novedosos, tales como vacunología reversa [Stranger-Jones y col., 2006], bibliotecas de expresión de *S. aureus* en fagos y posterior comparación de la reactividad de los clones frente un panel de sueros de individuos sanos e infectados [Clarke y col., 2006], análisis serológico del proteoma de *S. aureus* para identificar proteínas inmunorreactivas expresadas durante el desarrollo de mastitis [Le Marechal y col., 2011]. En conjunto este tipo de estudios ha resultado exitoso para identificar antígenos y desarrollar vacunas contra otros patógenos como *Streptococcus* del grupo A y B, el grupo B de meningococo, entre otros. Por lo tanto constituyen una alternativa a seguir para definir más y nuevos blancos necesarios para lograr protección efectiva contra *S. aureus* [Clarke y col., 2006; Stranger-Jones y col., 2006].

La cantidad de nuevos candidatos potenciales que surgieron de las estrategias de búsqueda previas, incentivó a los investigadores a probar formulaciones multicomponentes que incluyan varios antígenos, para combatir tanto infecciones por *S. aureus* en bovinos como en humanos. Estos ensayos dieron resultados que superaban los logrados con las inmunizaciones monovalentes. Castagliuolo y col., evaluaron en ratones 4 adhesinas de *S. aureus*: Efb, Cna, ClfA y FnBPA [Castagliuolo y col., 2006]. La inmunización génica con la mezcla de las 4 proteínas generó anticuerpos capaces de inhibir más eficientemente la adherencia de *S. aureus* a células del epitelio mamario que los anticuerpos generados contra cada antígeno individual. Bavari y col., compararon en ratones el grado de protección generado

por un inmunógeno basado en los superantígenos SEA, SEB, SEC1 y TSST-1 de *S. aureus* con el de cada antígeno individual [Bavari y col., 1999]. Nuevamente la formulación multicomponente produjo mejores resultados que los antígenos por separado, logrando un 100% de protección contra un desafío con la mezcla de las exotoxinas. Stranger-Jones y col., identificaron mediante vacunología reversa 19 antígenos de superficie, conservados entre las cepas de *S. aureus*, y los evaluaron en ratones [Stranger-Jones y col., 2006]. Una formulación multicomponente compuesta por IsdA, IsdB, SdrE y SdrD (estas últimas pertenecientes a la familia de proteínas con unidades repeticiones serina-aspartato, a la cual también pertenecen los antígenos más conocidos ClfA y ClfB) dió la mejor protección en un modelo murino comparado con los otros 15 antígenos propuestos. La vacuna multicomponente ofreció inmunidad protectora significativa contra cargas letales de distintas cepas de *S. aureus* (dando una supervivencia del 100%-60%, según la cepa) y generó anticuerpos con mayor actividad opsonofagocítica respecto de la vacunación con las moléculas individuales. En concordancia con el trabajo de Bavari y col., los títulos de IgG específica fueron mayores al inmunizar con la formulación combinada. Tuscherr y col., inmunizaron ratones de manera pasiva con sueros anti-CP5, anti-ClfA ó ambos [Tuscherr y col., 2008]. Luego de un desafío intramamario con una bacteria del serotipo CP5, los animales que recibieron los dos antisueros tuvieron un recuento bacteriano significativamente menor que los animales de los otros grupos. Además, en este trabajo los autores sugieren que las bacterias son capaces de dejar de expresar la cápsula y volverse cepas NT no encapsuladas, como vía de escape a los anticuerpos anti-CP [Tuscherr y col., 2008]. La inmunización pasiva con ambos antisueros inhibió completamente la aparición de esas mutantes de escape, lo cual sugiere que es conveniente combinar los antígenos CPs con proteínas de superficie para obtener formulaciones más efectivas para prevenir infecciones por *S. aureus*. Arrecubieta y col., combinaron rClfA, FnBPA y FnBPB y también encontraron que la formulación multicomponente daba mayor grado de protección contra un modelo murino de infección por colonización de un parche implantado, comparado con los antígenos por separado [Arrecubieta y col., 2008]. Una vez más, los resultados demuestran que la combinación de antígenos juega un rol importante en la protección con *S. aureus*. Por lo tanto, la evidencia indica que debe continuarse la investigación en este sentido, incorporando más antígenos a fin de aumentar la eficacia de las vacunas experimentales.

La baja eficacia del gran número de vacunas desarrolladas, podría deberse a la falta de una respuesta robusta del hospedador capaz de hacer frente a los mecanismos de virulencia de la bacteria [Hu y col., 2003; Chen y col., 2012]. La capacidad de *S. aureus* de producir biofilm (con propiedades antifagocíticas y anti-inflamatorias) y su habilidad para sobrevivir intracelularmente, sugieren la necesidad de que la vacuna no sólo genere una respuesta humoral, sino también que estimule la inmunidad mediada por células [Denis y col., 2009]. En este sentido, la inmunogenicidad de los antígenos y, consecuentemente, la eficacia de las vacunas, están determinadas ó influenciadas por el adyuvante. Los adyuvantes

empleados en las vacunas comerciales contra la mastitis causada por *S. aureus*, son los tradicionales. La vacuna Lysigin™ está formulada con hidróxido de aluminio, mientras que Startvac™ con un adyuvante de base oleosa. Ambos tipos de adyuvantes producen buenas respuestas de anticuerpos, pero son incapaces de estimular respuestas celulares del tipo TH₁ [Hu y col., 2003; Stills, 2005]. Estos adyuvantes tradicionales pueden ser suficientemente efectivos al formularlos en vacunas tipo bacterinas, en los que los propios PAMPs del patógeno, contribuyen por sí mismos a activar la inmunidad innata y a desencadenar la inmunidad adaptativa [Rueckert y Guzman, 2012]. En cambio, no resultan tan útiles en vacunas a subunidades que son menos inmunogénicas debido a la carencia de aquellas señales moleculares [Anderson, 2000; Rueckert y Guzman, 2012].

En los desarrollos experimentales de vacunas a subunidades contra *S. aureus* se ha comenzado a indagar en el uso de nuevos adyuvantes particulados, que actúen como sistema de entrega del antígeno a la vez de estimular el sistema inmune. Entre ellos se destaca el adyuvante ISCOM™, desarrollados por ISCONOVA y actualmente bajo licencia de CSL Behring. Son partículas de 40 nm, compuestas por lípidos, colesterol y saponinas que se mantienen unidos entre sí mediante fuerzas hidrofóbicas [Pearse y Drane, 2004]. Este adyuvante puede fabricarse con el antígeno incorporado a las nanopartículas ó bien, emplearse simplemente mezclado con el antígeno previo a la administración [Stills, 2005; Morein, 2007.b]. En este último caso se lo denomina ISCOM-matrix. Tanto como ISCOM ó ISCOM-matrix, el adyuvante es altamente eficiente para estimular la producción de una respuesta humoral robusta de todas las inmunoglobulinas [Sun y col., 2009]. Además, está reportado en distintas especies animales que estimula respuestas celulares CD4⁺ proinflamatorias/regulatorias balanceadas, así como también del tipo citotóxicas mediadas por linfocitos CD8⁺ [Mohan y col., 2013]. Durante el desarrollo de estas respuestas humorales/celulares balanceadas, se ha demostrado la inducción de múltiples mediadores innatos y adaptativos, y la expresión de citoquinas como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN-γ (consistentes con la respuesta mixta TH₁/TH₂) [Sun y col., 2009]. Se ha observado que las vacunas basadas en ISCOM-matrix desaparecen rápidamente del sitio de la inyección, migrando hacia el nodo linfoide, donde ocurriría la presentación antigénica [Pearse y Drane, 2004]. [Pearse y Drane, 2004]La explicación de dicho fenómeno radica en que, debido a su naturaleza particulada y las propiedades hidrofóbicas, es eficientemente capturado por las células APC y distribuído equitativamente entre el citosol y los compartimentos intracelulares [Pearse y Drane, 2004]. Además, la saponina presente en la partícula, media la activación del receptor de manosa DEC-205 presente en la superficie de células dentríticas favoreciendo la endocitosis [Reed y col., 2009]. De esta manera accede al procesamiento antigénico endosomal y proteosomal, para ser posteriormente presentado vía MHC clase I y II, respectivamente. Se piensa que son las propiedades de disrupción de las membranas de la saponina, las que contribuirían al escape endosomal y a la consiguiente liberación del antígeno al citosol. Aún no hay mucho conocimiento acerca de los receptores específicos a los cuales se une este adyuvante [Pearse y

Drane, 2004]. Estudios realizados en ratones deficientes en receptores tipo Toll o MyD88, permitieron determinar que el mecanismo de acción de los ISCOM/ISCOM-matrix es independiente de los primeros y absolutamente dependiente de los segundos [Wilson y col., 2012]. Informes recientes describen que este adyuvante activa al inflamosoma NALP3/ASC/Caspasa1 de las células presentadoras de antígenos, produciendo IL-1 β y IL-18 [Wilson y col., 2014].

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente comentados en el presente capítulo, se evaluó la respuesta humoral generada en bovinos por dos inmunógenos multicomponentes, formulados con el adyuvante de nueva generación ISCOM-matrix, para determinar el potencial como vacunas para el control de las IIMs causadas por *S. aureus*. Dichas formulaciones se basaron en los antígenos recombinantes y los polisacáridos conjugados producidos, respectivamente, en los capítulos II y III de esta tesis.

IV-2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV-2-1. Preparación de las formulaciones de inmunización

IV-2-1-1. Preparación del inmunógeno VacR1

Se utilizaron los antígenos recombinantes rBtox, rClf y rFnBP obtenidos previamente en el capítulo III. La actividad hemolítica de la rBtox se neutralizó mediante incubación con formol 1%, durante 24 horas a 4°C [Nickerson y col., 1993]. Posteriormente, el antígeno inactivado se incubó con GR de carnero para confirmar la pérdida total de actividad.

Primero se preparó una mezcla conteniendo a los antígenos recombinantes rBtox, rClf y rFnBP en concentración final de 0,4 mg/ml de cada uno de ellos. La mezcla anterior, se diluyó al medio con el adyuvante Iscom Matrix™ (ISCONOVA AB, gentilmente cedido por el Dr. Bror Morein) de manera de obtener una concentración final de proteínas totales de 0,6 mg/ml y 2 mg/ml de adyuvante. La formulación se denominó VacR1. La misma se pasó por filtro de 0,2 µm y se sometió a controles de esterilidad mediante la siembra de 100 µl de las mismas en placas de agar sangre [AII] e incubación por 48 hs a 37°C.

IV-2-1-2. Preparación del inmunógeno VacR258.

Se utilizaron las proteínas recombinantes rBtox, rClf, rFnBP y rIsdH obtenidos en el capítulo III y los polisacáridos conjugados CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ} obtenidos en el capítulo II. La rBtox se inactivó como se explicó anteriormente en el apartado IV-2-1-1.

Se preparó una mezcla conteniendo 0,4 mg/ml de cada uno de los antígenos rBtox, rClf, rFnBP e rIsdH y 0,6 mg de polisacáridos conjugados CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}. Dicha mezcla se diluyó al medio con el adyuvante Iscom Matrix™, obteniéndose una concentración de 0,8 mg/ml de proteínas recombinantes, 0,6 mg/ml de polisacáridos y 2 mg/ml de adyuvante. La formulación se denominó VacR258. La misma se pasó por filtro de 0,2 µm y se sometió a controles de esterilidad mediante la siembra de 100 µl de las mismas en placas de agar sangre e incubación por 48 hs a 37°C.

IV-2-1-3. Preparación de la formulación control

Como formulación control, se utilizó PBS estéril [AII], formulado con Iscom Matrix™ en cantidad necesaria para obtener una concentración de 2 mg/ml del adyuvante.

Todas las formulaciones fueron sometidas a un control de esterilidad, previo a la administración en los animales, mediante la siembra de 100 µl de las mismas en placas de agar sangre e incubación por 48 horas a 37°C. Las preparaciones se conservaron en heladera hasta su utilización, por no más de 72hs.

IV-2-2. Inmunización de bovinos

IV-2-2-1. Animales

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

IV-2-2-2. Protocolo de inmunización y muestreo

Se llevaron a cabo dos protocolos de inmunización de bovinos para evaluar las formulaciones multicomponente previamente obtenidas. En un primer ensayo se evaluó VacR1. Se trabajó con dos grupos de 4 animales cada uno, los cuales fueron vacunados con la formulación multicomponente (grupo VacR1) o PBS (grupo PBS1). En un ensayo posterior, se evaluó VacR258, empleando grupos de 8 animales cada uno, inmunizados con dicho inmunógeno (grupo VacR258) o PBS (grupo PBS2). En el cuadro 9 se detallan los ensayos realizados, los grupos de animales utilizados y las composiciones de las formulaciones evaluadas.

El esquema de inmunización y muestreo se detalla en la tabla 10. En ambos ensayos se administraron dos dosis de 1 ml del inmunógeno correspondiente, vía subcutánea en la zona cercana al ganglio supramamario. Antes del comienzo de la vacunación, se colectó una muestra de sangre por punción de la vena coccígea, lo cual se repitió cada 15 días hasta el día del parto. Dentro de las 24 horas post-parto se tomaron muestras de sangre y de leche de cada cuarto mamario, lo cual se repitió a los 7, 15, 21, 30 y 60 días [Tabla 10]. Una alícuota de leche de cada cuarto mamario fue utilizada para cultivo bacteriológico. Quinientos μl de leche de cada cuarto mamario de las muestras obtenidas a partir del día 7 post-parto se utilizaron para la preparación de muestras compuestas para determinación de anticuerpos. Estas muestras se centrifugaron por 15 minutos a 10.000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras de sangre se dejaron coagular mediante incubación a temperatura ambiente y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 1.500 rpm por 10 minutos. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. A partir del tercer mes y hasta el final de la lactancia, se realizaron muestreos de leche de forma mensual para su análisis bacteriológico. Se controló la aparición de reacciones adversas a los inmunógenos a través de la observación clínica periódica.

Tabla 9. Descripción de los grupos inmunizados y composición de las formulaciones evaluadas.

| Ensayo | n/ grupo | Nombre de grupo | Composición del inmunógeno | Vol. inmunización |
|--------|----------|-----------------|---|-------------------|
| N°1 | n= 4 | VacR1 | 0,2 mg rBtox 0,2 mg rClf 0,2 mg rFnBP 2 mg Iscom Matrix™ | 1 ml |
| | | PBS1 | PBS 2 mg Iscom Matrix™ | 1 ml |
| N°2 | n= 8 | VacR258 | 0,2 mg rBtox 0,2 mg rClf 0,2 mg rFnBP 0,3 mg de CP5-ASH _{PBQ} 0,3 mg de CP8-ASH _{PBQ} 2 mg Iscom Matrix™ | 1 ml |
| | | PBS2 | PBS 2 mg Iscom Matrix™ | 1 ml |

n= cantidad de animales por grupo.

Tabla 10. Esquema de inmunización y toma de muestra.

| Días | -45 | -30 | -15 | 0 | +7 | +15 | +21 | +30 | +60 |
|----------------------------|-----|-----|-----|---|----|-----|-----|-----|-----|
| Dosis | 1° | | 2° | | | | | | |
| Toma de muestras de sangre | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| Toma de muestras de leche | | | | x | x | x | x | x | x |

Se inmunizaron vaquillonas Holstein preñadas con la formulación VacR1 ó VacR258, y se tomaron muestras de sangre y leche a lo largo de todo el tiempo experimental. Los días previos al parto se indican con los números negativos, el día cero corresponde al día del parto y los días posteriores se indican con números positivos.

IV-2-2-3. Control de sanidad animal. Análisis bacteriológico de leche

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

de 2 cultivos positivos consecutivos [Smith y col., 1990]. La caracterización de los microorganismos aislados se realizó mediante observación microscópica y sobre la base de reacciones bioquímicas clásicas [Oliver y col., 2004].

IV-2-3. Determinación de anticuerpos en muestras de suero y leche

IV-2-3-1. Cinética de producción de IgG_{total}

Se realizaron ensayos de ELISA para determinar las cinéticas de producción de IgG_{total} para cada antígeno de las formulaciones VacR1 y VacR258. Se cubrieron placas de 96 pocillos de fondo plano (GBO) con 0,5 µg de cada proteína en 100 µl de solución amortiguadora de carbonato [AII], ó con 5 µg de los polisacáridos CP5 ó CP8 libres en 100 µl solución PBS 1x. Este paso de sensibilización se llevó a cabo incubando las placas 1 h a 37°C, seguido de 18 h a 8 °C. Luego, se bloquearon los pocillos con 200 µl una solución de suero de conejo al 1% (v/v), incubando 1 h a 37°C y posteriormente se procedió al agregado de 100 µl de los sueros de cada una de las muestras extraídas en cada punto de tiempo [Tabla 10; **Error! o se encuentra el origen de la referencia.**]. Los sueros se emplearon diluídos 1/8000; mientras que las muestras de leche se diluyeron 1/2000. La placa se llevó a estufa de 37 °C durante 1h. Finalmente, se incorporaron 100 µl del anticuerpo secundario anti-IgG_{total} bovina, conjugado a peroxidasa (Sigma), diluido 1/10.000. La placa se llevó 1 h a 37 °C. Luego de cada uno de los pasos anteriores, se realizaron tres lavados de 1 min con PBS-Tween [AII]. El inmunensayo se reveló agregando 1 gota de solución de sustrato/cromógeno TMB (Invitrogen), el cual se dejó desarrollando color durante 7 min. Transcurrido dicho tiempo se frenó la reacción con ácido sulfúrico 0,5 N. Las densidades ópticas se midieron en lector de microplacas (Biotek®, Elx808), a $\lambda = 450$ nm. Con las D.Os obtenidas en cada punto se construyó una curva de producción de IgG_{total} para cada uno de los antígenos formulados.

IV-2-3-2. Titulación de IgG_{total} e IgG₂ en sangre

Se titularon los anticuerpos específicos para cada uno de los antígenos formulados en VacR1 y VacR258. El ensayo se realizó siguiendo los pasos detallados en IV-2-3-1, pero empleando las muestras de suero y leche correspondientes a los días de máxima producción de anticuerpos (día +7) y en diluciones seriadas al medio.

Para la titulación de IgG₂ se utilizó como anticuerpo secundario un anti-IgG₂ bovino monoclonal (Sigma), diluido 1/2000. Dado que no está conjugado a paeroxidasa, se agregó un paso de incubación con un tercer anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch), diluido 1/10.000.

Tanto para la titulación de IgG_{total} como de IgG₂, la línea de corte se determinó a partir de la curva titulación promedio de los sueros controles, determinando la D.O a la cual se alcanza la meseta de

anticuerpos inespecíficos (nivel basal de anticuerpos inespecíficos). El título para cada suero se calculó realizando la regresión lineal en la zona de mayor linealidad de la curva de titulación. El título se definió como la dilución a la cual la recta de regresión interseca la línea de corte.

IV-2-3-3. Determinación de las subclases IgG₁ e IgG₂ en leche

En las muestras de leche tomadas el día +7, se determinaron también las subclases IgG₁ e IgG₂. Se llevó a cabo un ensayo de ELISA siguiendo los protocolos descritos previamente [IV-2-3-1 y IV-2-3-2], pero con algunas variaciones. Las determinaciones se realizaron sobre una única dilución de las muestras, diluídas 1/2000. La determinación de IgG₁ se realizó empleando un anticuerpo secundario anti-IgG₁ bovina conjugado a peroxidasa (Sigma) en dilución 1/1000. De la misma manera que para la titulación de IgG₂ sérica [IV-2-5-2], la determinación de IgG₂ en leche se realizó con el anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG₂ (Sigma) y el terciario anti-IgG_{total} de ratón conjugado a peroxidasa. Se graficaron las D.Os obtenidas para cada antígeno de las formulaciones VacR1 y VacR258.

IV-2-4-Evaluación funcional de los anticuerpos

IV-2-4-1. Inhibición de la actividad hemolítica de la nBtox por los anticuerpos séricos.

Purificación de la nBtox

La cepa 226, productora de nBtox (seleccionada según se describió en el capítulo III, III-2-5-1), se cultivó en caldo tripteína soya a 37°C durante toda la noche. Cinco ml de dicho cultivo se utilizaron para inocular 100 ml de caldo tripteína soya fresco, incubando durante 7 horas a 37°C en agitación. Transcurrido dicho tiempo se centrifugó a 16.000 g durante 40 minutos a 10°C. Se descartó el pellet y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0,22 µm para eliminar restos de bacterias enteras. Se agregó sulfato de amonio hasta 80% de saturación (56g/100ml), con agitación hasta disolución completa y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó nuevamente a 16.000 g durante 40 minutos a 10°C y el pellet obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de sulfato de amonio a 80% de saturación. Se centrifugó a 27.000 g durante 15 minutos a 10°C y se resuspendió el pellet en mínimo volumen de PBS. Finalmente se dializó contra 50 volúmenes de PBS durante 24 horas [Low y Freer, 1977]. El producto se conservó a - 20°C hasta su utilización.

El extracto proteico obtenido se evaluó por SDS-PAGE al 15%, seguido de tinción con azul de Coomassie [AI-3].

Aislamiento de glóbulos rojos de carnero

Se obtuvieron 20 ml de sangre de carnero con anticoagulante (EDTA 1%) por punción de la vena yugular. Tres ml de sangre se llevaron a 10ml con PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 2.500 rpm para

sedimentar los GR. Se extrajo el sobrenadante con pipeta Pasteur y se repitieron lavados hasta obtener un sobrenadante limpio. Finalmente se tomaron 500 µl de GR y se diluyeron en 10 ml de Solución diluyente de GR [AII].

Ensayo de inhibición de la hemólisis

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en U. Por un lado, se enfrentaron 100 µl de diluciones seriadas de la nBtox a 100 µl de GR de carnero para determinar el título de hemólisis de la proteína. Mientras que por otro lado, se pre-incubaron las mismas diluciones de la proteína con 100 µl de los sueros tomados al día +7 (diluídos 1/500) y luego se incorporaron los GR. Se incubó durante 1 hr a 37°C, y luego 18 hs a 4°C. Se registraron los títulos obtenidos al final de cada incubación [Wadstrom y Mollby, 1971]. Los resultados también se expresaron como porcentajes de hemólisis (% hemólisis). Se consideró 100% de hemólisis a la cantidad de diluciones realizadas a la nBtox que presentaron hemólisis positiva, mientras que los porcentajes para los grupos inmunizados se calcularon según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis }_i = \frac{\text{título hemólisis }_i \text{ (grupo inmunizado)} \times 100}{\text{título hemólisis promedio (sin suero)}} ; i = \text{cada animal inmunizado}$$

IV-2-4-2. Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a fibrinógeno (Fg) mediada por los anticuerpos séricos.

Purificación de fibrinógeno a partir de plasma bovino

Se extrajeron 100 ml de sangre bovina en 4% de citrato de sodio y se obtuvo el plasma mediante centrifugación a 2000 rpm, 20 min. La purificación de Fg se realizó según el protocolo de Ismail [Ismail, 2012]. El plasma se congeló 18 hs a -80°C y luego se descongeló lentamente manteniéndolo a 4°C durante 7 hs. Se centrifugó a 4000 rpm por 20 min a 4°C. El crio-precipitado se resuspendió en buffer de resuspensión y se dejó en agitación toda la noche, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la suspensión se enfrió en hielo y se agregó 10 % de etanol. Nuevamente se realizó una incubación en hielo toda la noche y se centrifugó a 4000 rpm, 4 °C, 20 min. El pellet se resuspendió en solución de resuspensión conteniendo 20 mM Tris-base, 55 mM de citrato de sodio y 27 mM de lisina, pH= 6,8 y se dializó contra buffer de citrato de sodio a temperatura ambiente. Se cuantificó el contenido proteico en el extracto final por fluorometría, según instrucciones del fabricante (Qubit® Protein Assay Kit, Invitrogen). Se fraccionó el Las fracciones de proteínas purificadas se dividieron en alícuotas y se conservaron a -80 °C. El extracto proteico obtenido se evaluó por SDS-PAGE al 15%, seguido de tinción con azul de Coomasie [AI-4].

Preparación de una bacterina de *S. aureus*

Se utilizó la cepa de referencia Reynolds de *S. aureus*, a partir de la cual se había aislado la secuencia de ClfA para la producción de la proteína de manera recombinante [III-2-1-1] y por lo tanto con capacidad para expresar la molécula nativa. La cepa se cultivó en agar salado durante toda la noche a 37°C, se cosecharon las bacterias en PBS estéril y se inactivó con 0,5% de formalina por 24 horas a 37°C. Se realizaron 3 lavados mediante centrifugaciones de 10 minutos a 5.000 rpm para eliminar el exceso de formol. Finalmente el pellet de células se resuspendió en PBS estéril a concentración final de 1.10^9 Ufc/ml.

Ensayo de unión a Fg

Para el ensayo de adherencia propiamente dicho, se llevó a cabo según Hartford y col. con algunas modificaciones [Hartford y col., 1997; Hartford y col., 2001]. Se sensibilizaron microplacas de 96 pocillos fondo en U, con 2 µg del Fg purificado, diluido en PBS 1x, pH= 7,2. La placa se llevó a estufa de 37 °C, 1h. Luego de tres lavados de 1 min con PBS-Tween, se bloquearon los pocillos con BSA al 2% (en PBS 1x, pH= 7,2), 1h en estufa. Por un lado se agregaron 1×10^8 Ufc de bacterias formoladas. Esto permite determinar la adherencia de la bacteria al Fg. Por otro lado, las bacterias se incubaron 1 h a 37 °C y agitación con los sueros bovinos VacR1, VacR258 ó PBS, tomados al día +7 (diluídos 1/500). En ambos casos se incubaron las placas 2 h a 37°C y se realizaron tres lavados, seguidos de un paso de fijación con glutaraldehído al 2%. Finalmente se procedió a la tinción con 100 µl de Cristal violeta (0,5 % w/v), 5 min a temperatura ambiente, que da intensidad de color proporcional a la cantidad de bacterias adheridas al pocillo. Para la lectura del ensayo, se descartó el exceso de colorante y se agregaron 100 µl/pocillo de ácido acético 5% para resuspender el colorante adherido a las bacterias. La placa se leyó a $\lambda = 620$ nm. Los resultados se expresaron como D.O y como porcentajes de adherencia a Fg, considerando a las D.Os obtenidas para las bacterias pre-incubadas con los sueros PBS como el 100% de unión.

IV-2-4-3. Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a fibronectina (Fn) mediada por los anticuerpos séricos.

Preparación de una bacterina de *S. aureus*

Se empleó la misma bacterina utilizada para el ensayo de inhibición a Fg [IV-2-4-2], ya que la cepa de referencia Reynolds de *S. aureus*, posee la secuencia de FnBPA [III-2-1-1] y, por lo tanto tiene la capacidad para expresar la molécula nativa.

Preparación de un suero anti-bacterina

Se preparó un suero anti-bacterina, para lo cual se inmunizaron ratones con 2 dosis intraperitoneales de 1×10^7 Ufc de las bacterias formoladas, formuladas con el adyuvante Iscom Matrix™ (ISCONOVA, Suecia).

La especificidad del suero obtenido se comprobó por ELISA indirecto, empleando bacterina como antígeno.

Purificación de los anticuerpos anti-rFnBP a partir de los sueros VacR258.

Para el ensayo de adherencia a Fn, se purificaron los anticuerpos específicos a partir de los sueros obtenidos al día 7 post- parto, con el fin de remover la Fn soluble y otras proteínas del plasma que pueden interferir con la unión [Schennings y col., 1993]. Se saturó una porción de membrana de nitrocelulosa con la proteína recombinante rFnBP, mediante incubación con la solución proteica de concentración 0,38 mg/ml, 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Luego de 3 lavados con PBS-Tween y un paso de bloqueo de la membrana con BSA 2%, se agregó un pool de los sueros VacR1 ó VacR258 tomados al día +7. Se dejaron interaccionar 90 min a temperatura ambiente y agitación. Finalmente se realizaron tres lavados y se recuperaron los anticuerpos unidos a la membrana mediante 5 min de tratamiento con una solución de glicina-HCl, pH=2,3. Para utilizar como otro control negativo se purificaron anticuerpos anti-rBtox.

Ensayo de unión a Fn

Para el ensayo de adherencia, se siguió un protocolo descrito previamente realizando algunas modificaciones [Schennings y col., 1993]. Se sensibilizaron placas fondo plano con 1 µg de Fn (Sigma-Aldrich), incubando 1 h a 37 °C. Luego de un paso de bloqueo de los pocillos con suero de conejo al 1%, se agregaron las bacterias formoladas (1×10^8 ufc/pocillo), ya sea pre- incubadas con una dilución 1/10 de los anticuerpos purificados o sin pre-incubar. En el segundo caso, se determina la adherencia normal de las bacterias a Fn, mientras que en el primer caso, se determina si los anticuerpos tienen capacidad de inhibir la unión de la bacteria a Fn. Después de 1 h a 37 °C, se procedió al agregado de una dilución 1/200 del suero anti-bacterina e incubación de la placa en las mismas condiciones previas. Por último se incorporó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch), diluído 1/10.000 y la placa se llevó 1 hr a 37 °C. Entre cada paso se realizaron 3 lavados de 1 min con PBS-Tween. El revelado del ensayo se realizó mediante el agregado de una gota/pocillo de cromógeno TMB (Invitrogen) y posterior frenado de la reacción con H₂SO₄ 0,5 N.

La adherencia a Fn se determinó a partir de las D.OS a $\lambda = 450$ nm. Además, los resultados se expresaron en porcentajes de adherencia a Fn, considerando el 100% unión a los valores de D.O obtenidas para las bacterias pre-tratadas con los sueros PBS.

IV-2-4-4. Ensayo de opsonofagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos

Preparación de bacterias marcadas

Se prepararon bacterias marcadas con FITC. Para esto se cultivó *S. aureus* Reynolds en agar salado toda la noche a 37°C. Las bacterias se resuspendieron en PBS y se centrifugaron 3 minutos a 10.000 rpm. Luego se resuspendieron en 1 ml de FITC/NaHCO₃ y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS hasta obtener un sobrenadante limpio. Finalmente se resuspendieron en solución de hasta concentración de 1x10⁸ ufc/ml.

Obtención de neutrófilos bovinos

Se obtuvieron neutrófilos a partir de sangre bovina [Siemsen y col., 2007]. Se extrajeron 50 ml de sangre bovina de un animal sano y que no hubiera sido incluido en el ensayo de inmunización, mediante punción de vena yugular y se transfirieron a un tubo plástico conteniendo 5 ml de EDTA 1%. La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 1.400 rpm. Luego de la centrifugación y utilizando una pipeta plástica se removió el plasma y la fracción leucocitaria. A la capa de glóbulos rojos presente en el fondo del tubo se le agregó 50 ml de solución de lisis y se incubó durante 10 minutos en hielo. La reacción se detuvo con 50 ml de PBS y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 1.400 rpm. El pellet celular se resuspendió en 9 ml de PBS, se transfirió a un tubo conteniendo 3 ml de Histopaque 1083 (Sigma) y se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 2.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de neutrófilos con 10 ml de PBS. El pellet de células se resuspendió en 1 ml de solución de fagocitosis y se realizó el recuento y la determinación de la viabilidad celular mediante exclusión con Azul de tripán en cámara de Neubauer. Finalmente las células se diluyeron en solución de fagocitosis hasta concentración 1x10⁷ cel/ml.

Ensayo de fagocitosis

Para el ensayo de fagocitosis propiamente dicho se siguió un protocolo previamente descrito [Siemsen y col., 2007] [AII], utilizando los sueros obtenidos al día 7 post-parto de cada uno de los grupos evaluados. Se utilizaron placas estériles de 24 pocillos con fondo plano (Nunc). Cien µl de la suspensión de bacterias/FITC (1x10⁷ ufc) y 300 µl de solución de fagocitosis se sembraron en cada pocillo. Se agregaron 5 µl de los sueros a evaluar y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Posteriormente se agregaron 100 µl de la suspensión de neutrófilos (1x10⁶ cél.) y se incubó por otros 30 min. Transcurrido dicho tiempo se frenó la reacción con 500 µl de solución de frenado fría [AII]. El contenido de cada pocillo se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 5 minutos a 1400 rpm. Las muestras se resuspendieron en 500 µl de PBS-BrEt para eliminar la fluorescencia extracelular [Weingart y col., 1999] y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 1.400 rpm para eliminar los restos de BrET y se resuspendieron los pellets en 500 µl de solución de citometría suplementado con 1% de formol. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Se utilizaron como controles bacterias opsonizadas sin neutrófilos, neutrófilos sin bacterias, y neutrófilos

con bacterias sin anticuerpos. Las muestras se conservaron a 4°C por 1 mes hasta su lectura en citómetro de flujo.

Citometría de flujo

Para el análisis del ensayo por citometría, se adquirieron 50.000 eventos en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba). La región 1 (R1), conteniendo a los PMN, se seleccionó teniendo en cuenta los parámetros de tamaño *versus* complejidad citoplasmática. La intensidad de fluorescencia sobre R1 se graficó en histogramas de escala logarítmica. Los datos se analizaron con el programa WinMDI. Se calculó el porcentaje de PMN con bacterias internalizadas ($[\text{PMN con bacterias internalizadas}] / [\text{PMN totales}] \times 100$) y se utilizó el parámetro de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) como una estimación del número de bacterias internalizadas por neutrófilo positivo [Zetterlund y col., 1998].

IV-2-4-5. Inhibición de la invasión de células epiteliales mamarias bovinas por *S. aureus*

Preparación de las bacterias

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

Cultivo de células epiteliales mamarias bovinas

Se utilizó una línea de células epiteliales de glándula mamaria bovina, MAC-T, producida mediante la transfección de células alveolares mamarias bovinas con el antígeno T SV-40 [Huynh y col., 1991]. Estas células se hicieron crecer en placas estériles de 24 pocillos con fondo plano (Axygen) conteniendo medio D-MEM, a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Ensayo de adherencia e internalización

Estas pruebas se realizaron en base a lo previamente descrito por Almeida y col. [Almeida y col., 1996] [All]. Tres ml de la suspensión de *S. aureus* se opsonizaron durante 1 h a 37 °C con los sueros de sangre y leche obtenidos al día 7 posterior al parto. Luego, cada mezcla se agregó a la monocapa de MAC-T a una multiplicidad de infección (MOI, relación de bacterias por célula) de 100, durante 2 h, a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. El número de células epiteliales por pocillo fue estimado por recuento en hemocitómetro para determinar la razón bacteria: célula epitelial en el estudio de invasión. Las bacterias extracelulares se eliminaron mediante la incubación con MCC suplementado con gentamicina (100 µg/ml), durante 2 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Se lavó nuevamente 2 veces con PBS, tratadas con

tripsina 0,25 %-EDTA 0,1 % (Gibco BRL), y lisadas con Triton X-100 0,025 %(v/v) por 15 min en agitación, para liberar las bacterias internalizadas. Se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10 de los contenidos de cada pocillo, los cuales se sembraron, por duplicado, en placas con agar sangre. Luego de incubar durante 18 h a 37 °C se realizó el recuento de ufc recuperadas, empleando la técnica estándar de recuento en placa desarrollada por [Miles y col., 1938]. Cada muestra se realizó por triplicado y el ensayo se repitió 5 veces como mínimo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de internalización, considerando como el 100% de internalización al número de bacterias recuperadas luego de la opsonización de las mismas con los sueros del grupo PBS. Como control negativo (0 % de invasión) se empleó la cepa DH5- α de *Escherichia coli* (Invitrogen), la cual es incapaz de invadir células epiteliales mamarias bovinas. Las características de la cepa se detallan en el capítulo III [III-2-2-1, tabla 6].

IV-2-7. Análisis estadísticos

Para todos los ensayos, las diferencias entre los grupos inmunizados y controles se analizaron mediante el test no paramétrico Mann-Whitney ($p < 0,05$), utilizando el programa estadístico GraphPad Prism v.5.0. Las diferencias significativas entre grupos se indicaron con asteriscos o letras: $a < 0,001$, $b < 0,01$ y $c < 0,05$.

IV-3.RESULTADOS

En el transcurso del ensayo, se realizaron controles de sanidad los animales con el fin de descartar aquellos que presenten infecciones por *S. aureus* que puedan interferir en los resultados. Por un lado, durante los controles veterinarios de los animales, no se detectaron casos de mastitis clínicas. Tampoco se evidenció la presencia de *S. aureus* en las muestras de leche extraídas y sometidas a análisis bacteriológicos.

Cabe mencionar que, además, los inmunógenos evaluados no provocaron reacciones adversas en ninguno de los animales empleados

IV-3-1. Evaluación de la respuesta humoral en suero.

IV-3-1-1. Cinética de producción de IgG_{total}

Se emplearon las muestras de sangre recolectadas durante el período experimental para determinar la IgG_{total} específica para cada antígeno formulado en VacR1 y VacR258. Con los valores obtenidos se realizaron las curvas de anticuerpos que se muestran en las figuras 29 y Figura 30. Se puede observar que las cinéticas son idénticas para todos los antígenos de una misma formulación, e incluso son similares al comparar ambos ensayos. Cada dosis administrada contribuyó a aumentar los niveles de anticuerpos, respecto de los encontrados en los sueros preinmunes, generando picos de producción a los días -30 y +7. Para los antígenos proteicos de ambas formulaciones, las D.Os fueron significativamente superiores a los de los respectivos grupos control a lo largo de todo el período experimental ($p < 0,05$). En el caso de los antígenos polisacáridos de VacR258, la respuesta humoral fue más baja que la inducida por las proteínas, resultando en valores de IgG_{total} significativamente mayores a las del grupo PBS2 sólo hasta el día +15 ($p < 0,05$). Inmediatamente después, los anticuerpos disminuyen hasta niveles basales.

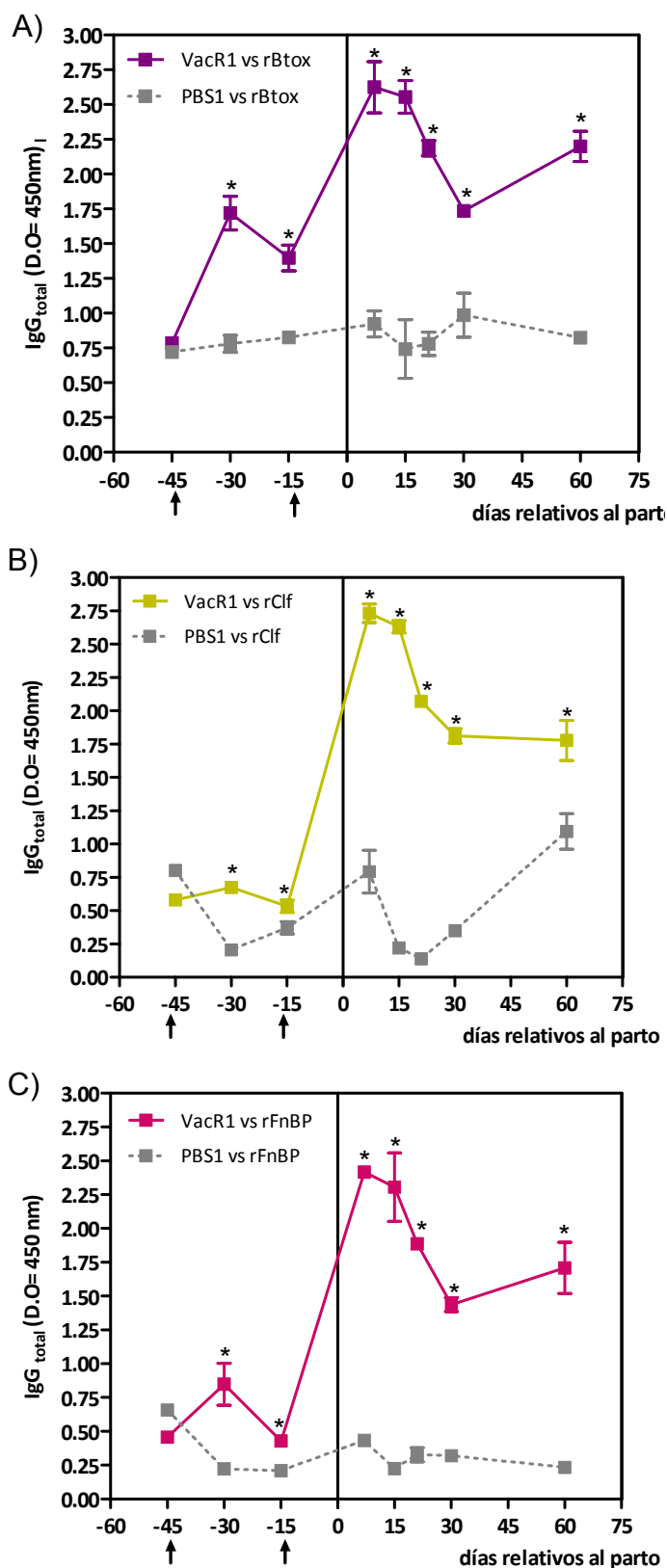


Figura 29. Cinéticas de producción de IgG_{total} en muestras de suero proveniente de vaquillonas inmunizadas con VacR1. Grupos de 4 vaquillonas Holstein preñadas fueron inmunizadas con la formulación VacR1 ó con PBS, a los días -45 y -15 previos al parto (dosis indicadas con flechas). En las muestras de suero tomadas a distintos tiempos se determinaron los niveles de IgG_{total} anti-rBtox (A), anti-rClf (B) y anti-rFnBP (C) y se construyeron las curvas de producción. Se muestra la media \pm DE en cada punto. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo PBS1 (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

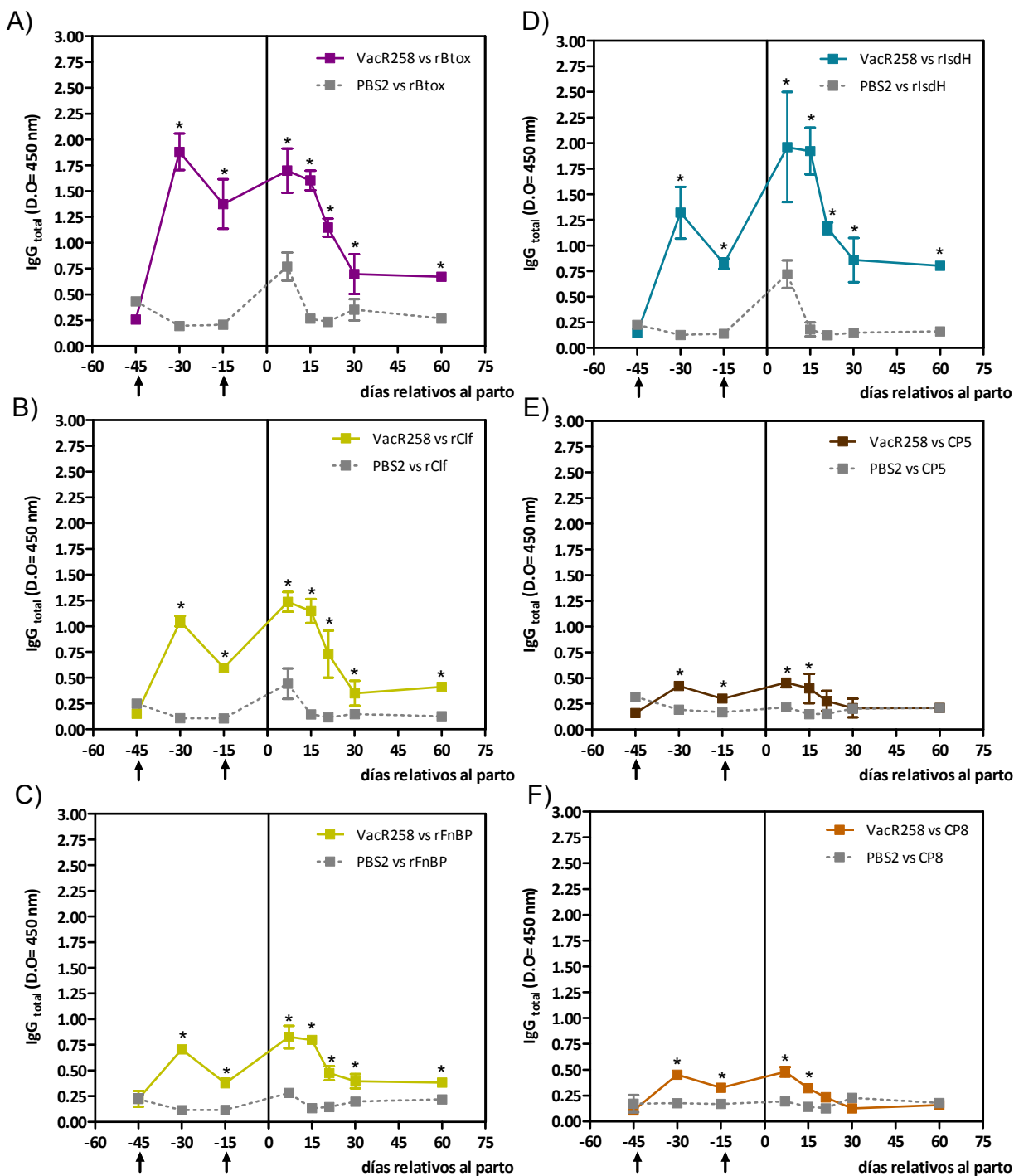


Figura 30. Cinéticas de producción de IgG_{total} en muestras de suero proveniente de vaquillonas inmunizadas con VacR258. Grupos de 8 vaquillonas Holstein preñadas fueron inmunizadas con la formulación VacR258 ó con PBS, a los días -45 y -15 previos al parto (inmunizaciones indicadas con flechas). En las muestras de suero tomadas a distintos tiempos se determinaron los niveles de IgG_{total} anti-rBtoX (A), anti-rClf (B), anti-rFnBP (C), anti-IsdH (D), anti-CP5 (E), anti-CP8 (F) y se construyeron las curvas de producción anticuerpos. Se muestra la media \pm DE en cada punto. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control ($p < 0,05$).

IV-3-1-2. Titulación de IgG_{total} e IgG_2

Se determinaron los títulos de IgG_{total} e IgG_2 generados contra cada antígeno de las formulaciones multicomponentes en las muestras de suero tomadas el día +7, momento correspondiente a la máxima producción de anticuerpos en las curvas de cinética. Como puede observarse en las figuras 31 y 32, tanto los títulos de IgG_{total} como de IgG_2 fueron significativamente superiores en los grupos VacR1 y VacR258 que en los controles PBS1 y PBS2, respectivamente ($p < 0,05$).

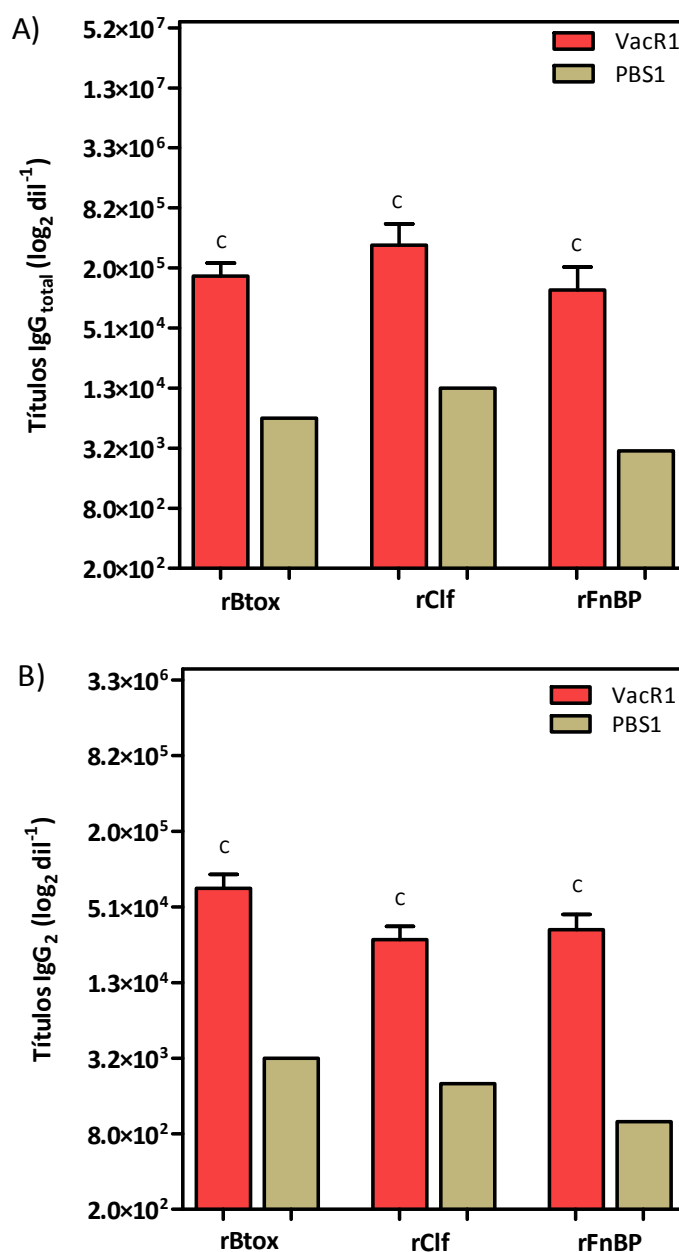


Figura 31. Títulos de anticuerpos sanguíneos obtenidos para la formulación VacR1. Sobre las muestras de suero tomadas el día +7, se determinaron por ELISA los títulos de IgG_{total} (A) e IgG_2 (B) específicos contra cada componente de VacR1. Se muestran las medias \pm DE. ^cDiferencias significativas respecto de PBS1 (Mann Whitney, $p < 0,05$).

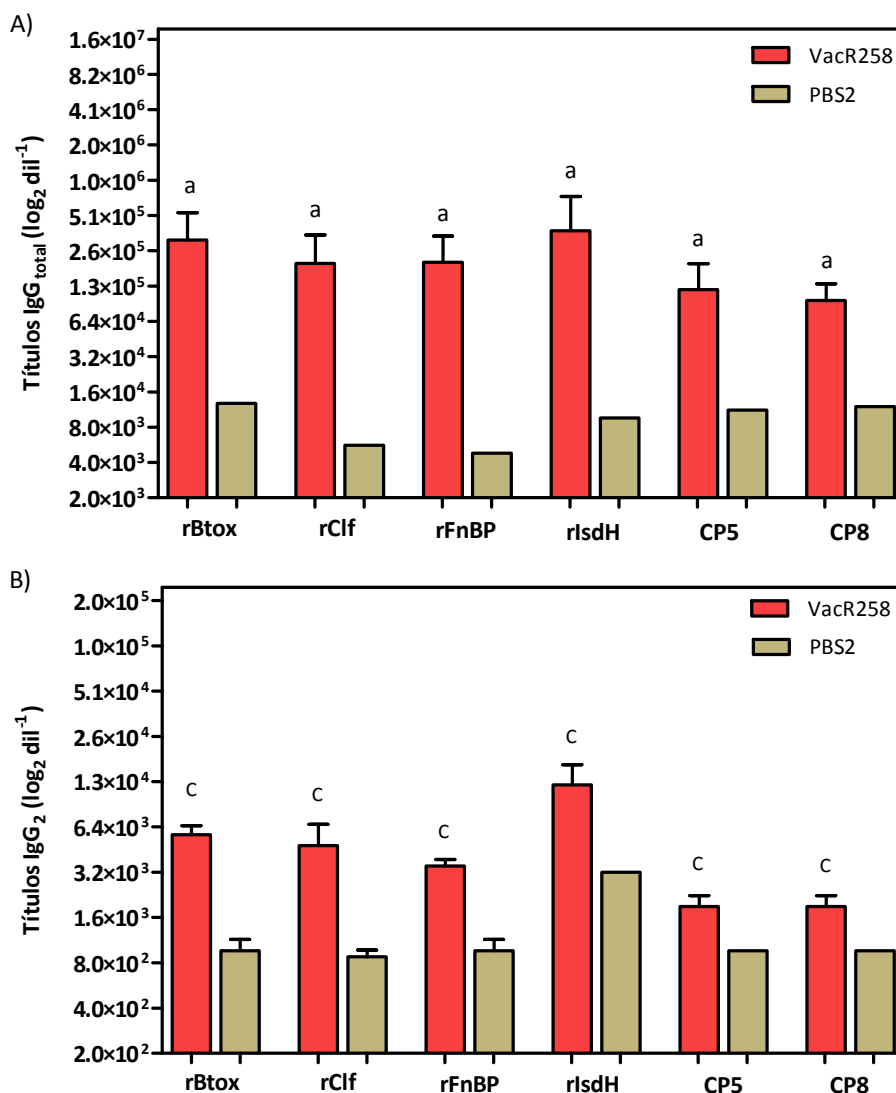


Figura 32. Títulos de anticuerpos sanguíneos obtenidos para la formulación VacR258. Sobre las muestras de suero tomadas el día +7, se determinaron por ELISA los títulos de IgG_{total} (A) e IgG₂ (B) específicos contra cada componente de VacR258. Se muestran las medias ±DE. Las letras indican diferencias significativas respecto de PBS2 (Mann Whitney, a< 0,001; c<0,05).

IV-3-2. Evaluación de la respuesta humoral en leche.

IV-3-2-1. Cinética de producción de IgG_{total}

Se realizaron las curvas de producción de IgG_{total} en leche para cada antígeno de las formulaciones multicomponentes. Las cinéticas resultaron idénticas, tanto entre los distintos antígenos como entre ambos ensayos [Figura 33 y 34]. El máximo de producción de anticuerpos en leche ocurre el día +7, produciéndose posteriormente un rápido decaimiento. Los niveles de anticuerpos anti-proteínas se mantuvieron estables por tiempos, evidenciando señales de D.O significativamente mayores que el control hasta el día +30 (p< 0,05). En cambio, los anticuerpos anti-polisacáridos, alcanzaron niveles basales de IgG_{total} en el día +15.

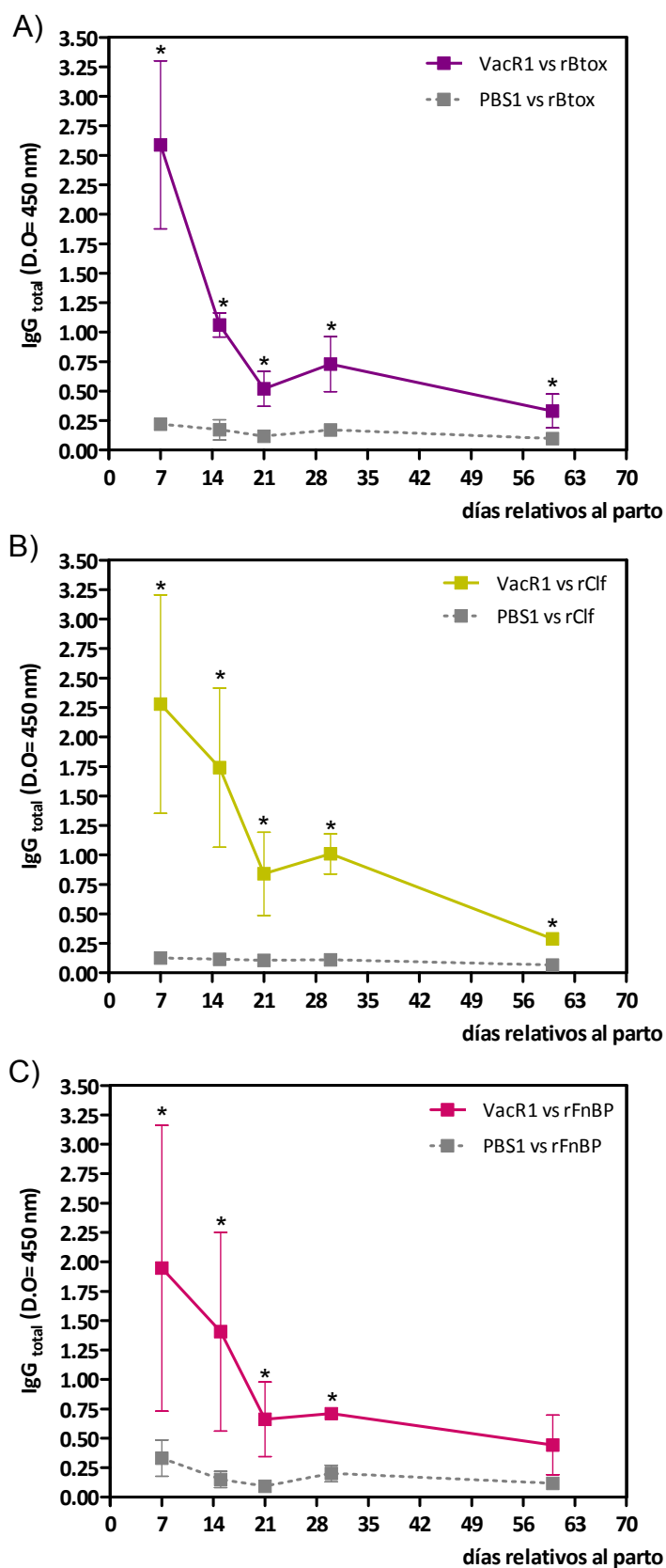


Figura 33. Cinéticas de producción de IgG_{total} en muestras de leche proveniente de vaquillonas inmunizadas con VacR1. Los niveles de IgG_{total} anti-rBtox (A), anti-rClf (B) y anti-rFnBP (C) se determinaron a los distintos tiempos mediante ensayos de ELISA y se construyó la curva de producción. Se muestra la media ±DE en cada punto. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo PBS1 (Mann-Whitney, p < 0,05).

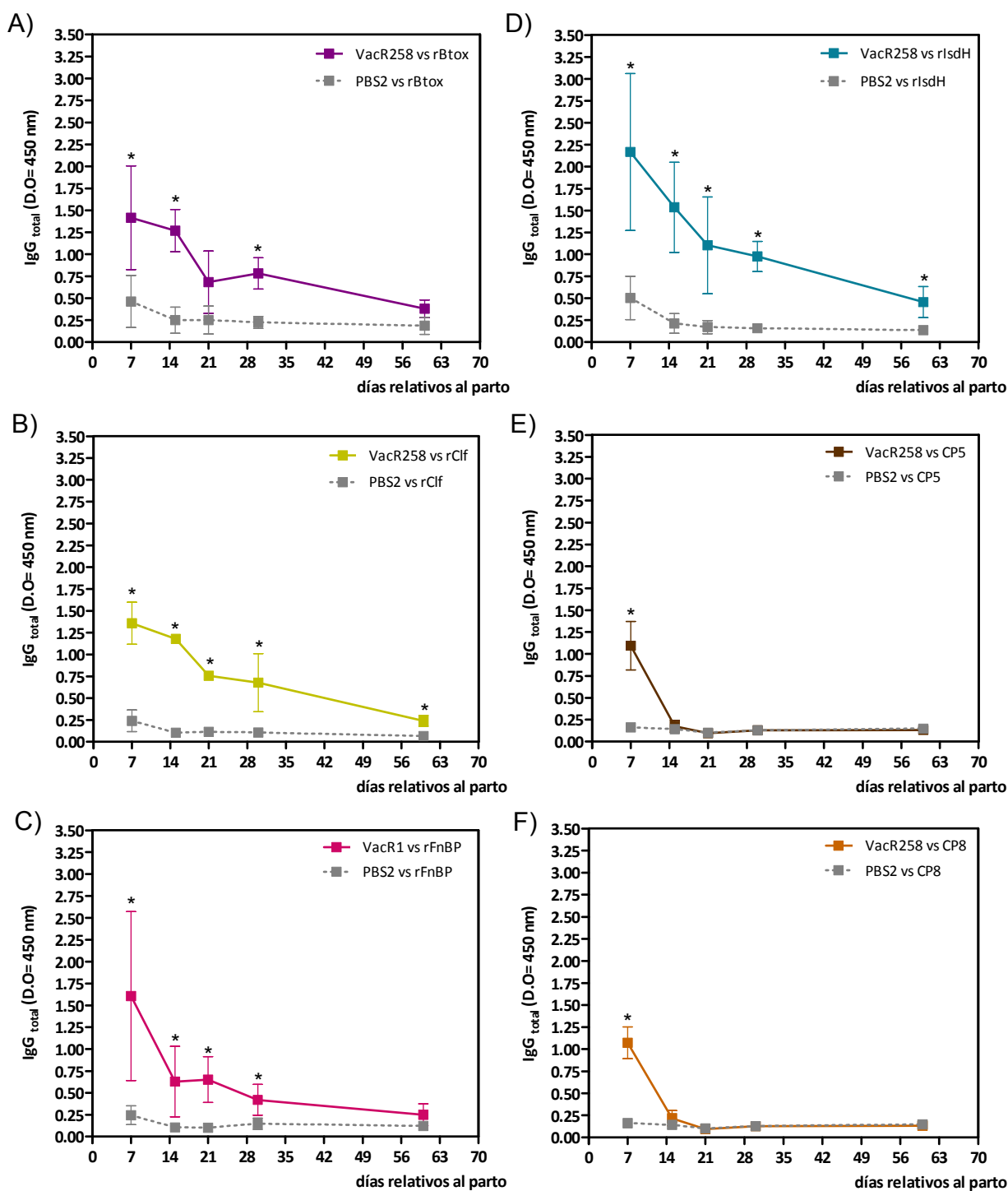


Figura 34. Cinéticas de producción de IgG_{total} en muestras de leche provenientes de vaquillonas inmunizadas con VacR258. Los niveles de IgG_{total} anti-rBtox (A), anti-rClf (B), anti-rFnBP (C), anti-rIsdH (D), anti-CP5 (E) y anti-CP8 (F) se determinaron a los distintos tiempos mediante ensayos de ELISA y se construyó la curva de producción. Se muestra la media ± DE en cada punto. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo PBS2 (Mann-Whitney, p < 0,05).

IV-3-2-2. Titulación de IgG_{total}

Se determinaron los títulos de IgG_{total} en leche, sobre las muestras tomadas el día +7. Se obtuvieron altos títulos de anticuerpos para todos los antígenos recombinantes formulados en VacR1 y/o VacR258 [Figura 35]. Dichos valores fueron significativamente mayores que los determinados para los grupos controles ($p < 0,05$). No se lograron detectar diferencias entre los títulos de IgG_{total} anti-polisacáridos obtenidos para el grupo VacR258 y el control PBS2.

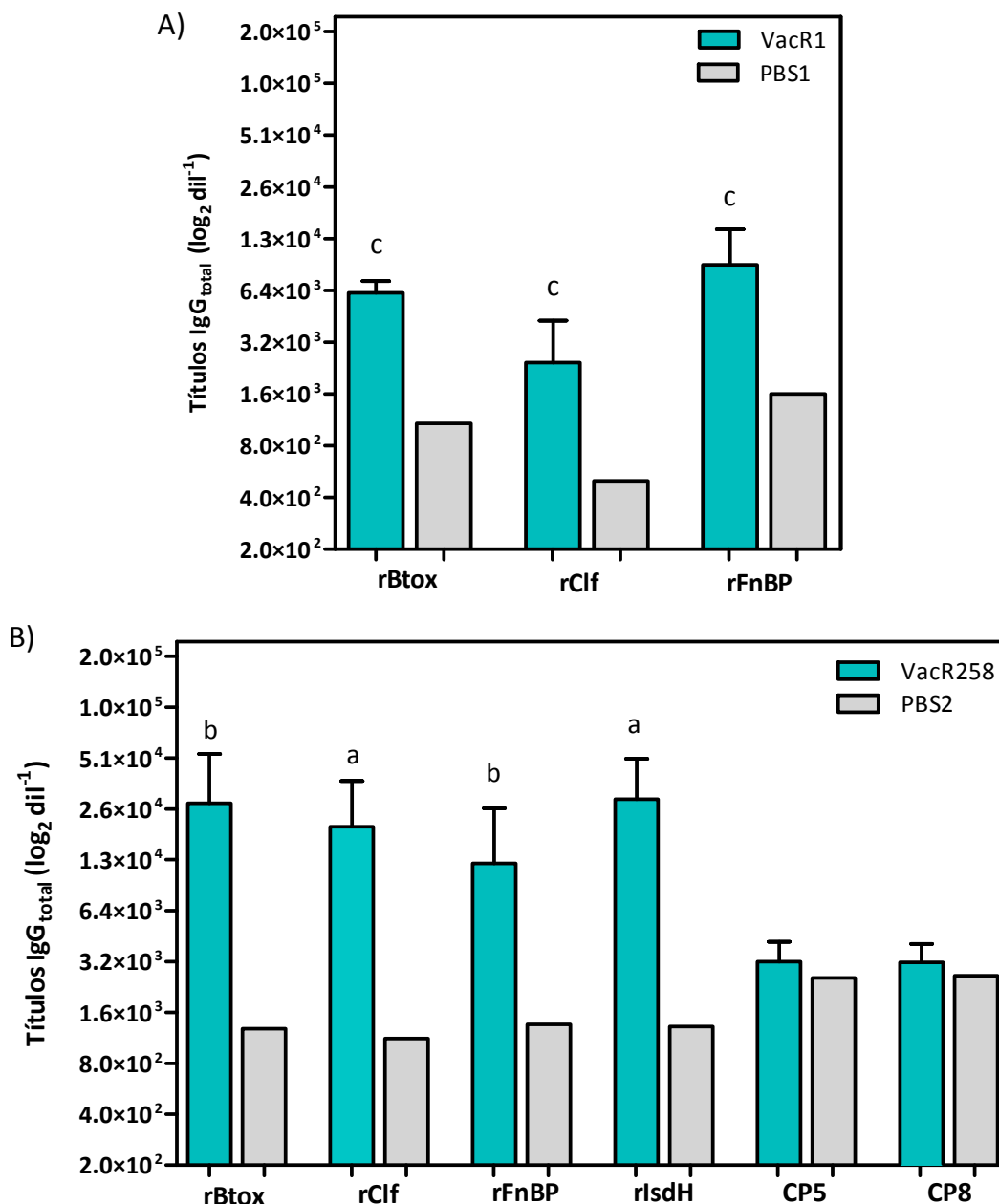


Figura 35. Títulos de IgG_{total} en muestras de leche provenientes de vaquillonas inmunizadas con VacR1 (A) y VacR258 (B). Sobre las muestras de suero tomadas el día +7, se determinaron mediante de ELISA los títulos de IgG_{total} específicos contra cada componente de la formulación VacR1 y VacR258. Se muestran las medias ± DE. Las letras indican diferencias significativas respecto de los grupos controles (Mann Whitney, $a < 0,001$, $b < 0,01$, $c < 0,05$).

IV-3-2-3. Determinación de IgG₁ e IgG₂

Se determinó la presencia de las subclases de IgG en las muestras de leche tomadas el día +7. Los niveles de IgG₁ se vieron incrementados respecto de los controles ($p < 0,05$) para todos los antígenos formulados en VacR1 y VacR258 [Figuras 36 y 37.A], respectivamente]. La subclase IgG₂ se pudo detectar sólo en las muestras correspondientes al grupo VacR258 [Figura 37.B]. Sólo los valores de IgG₂ dirigida contra los antígenos proteicos resultaron significativamente superiores al control ($p < 0,05$, respecto del control).

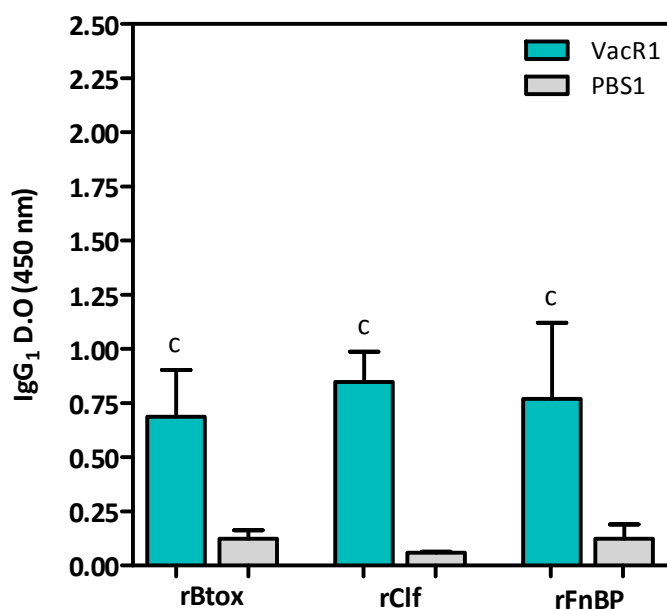


Figura 36. Niveles de IgG₁ en muestras de leche proveniente de vaquillonas inmunizadas con VacR1. Sobre las muestras de suero tomadas el día +7, se determinaron mediante de ELISA los niveles de IgG1 específicos contra cada componente de la formulación VacR1. Se muestra la media \pm DE. ^cDiferencia significativa respecto del grupo PBS2 (Mann Whitney, $p < 0,05$).

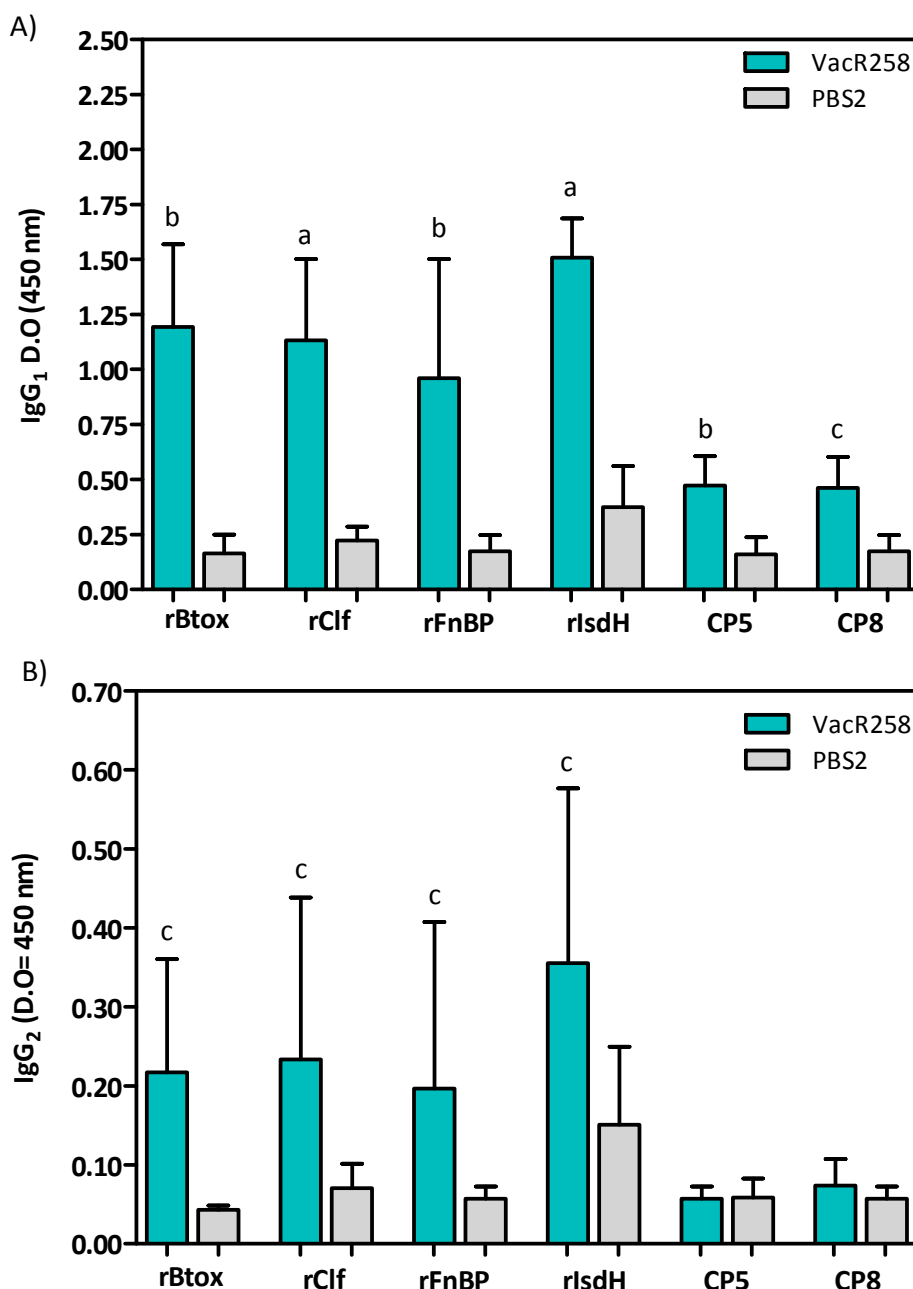


Figura 37. Subclases de IgG en muestras de leche de vaquillonas inmunizadas con VacR258. Sobre las muestras de suero tomadas el día +7, se determinaron mediante de ELISA los niveles de IgG₁(A) e IgG₂ (B) específicos contra cada componente de la formulación. Se muestra la media ±DE. Las letras indican diferencias significativas respecto del grupo PBS2 (Mann Whitney, a<0,001; b< 0,01; c< 0,05).

IV-3-3. Evaluación funcional de los anticuerpos

Para los ensayos de funcionalidad de los anticuerpos obtenidos de la inmunización de los bovinos con VacR1 y VacR258, se emplearon las muestras de suero o leche extraídas el día +7, momento en el cual se determinó la máxima presencia de anticuerpos.

IV-3-3-1. Inhibición de la actividad hemolítica de la nBtox

Los resultados del ensayo se muestran en la figura 38. El título de hemólisis de la proteína nBtox fue de $2,1 \times 10^6$. Al tratar la hemolisina con los sueros VacR1 y VacR258 se produjo una disminución de la actividad hemolítica, dando títulos de $3,2 \times 10^2$ (84% hemólisis) y 2×10^2 (70% de hemólisis), respectivamente. A pesar de que los sueros control también provocaron inhibición inespecífica de la hemólisis, la diferencia con los grupos inmunizados fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

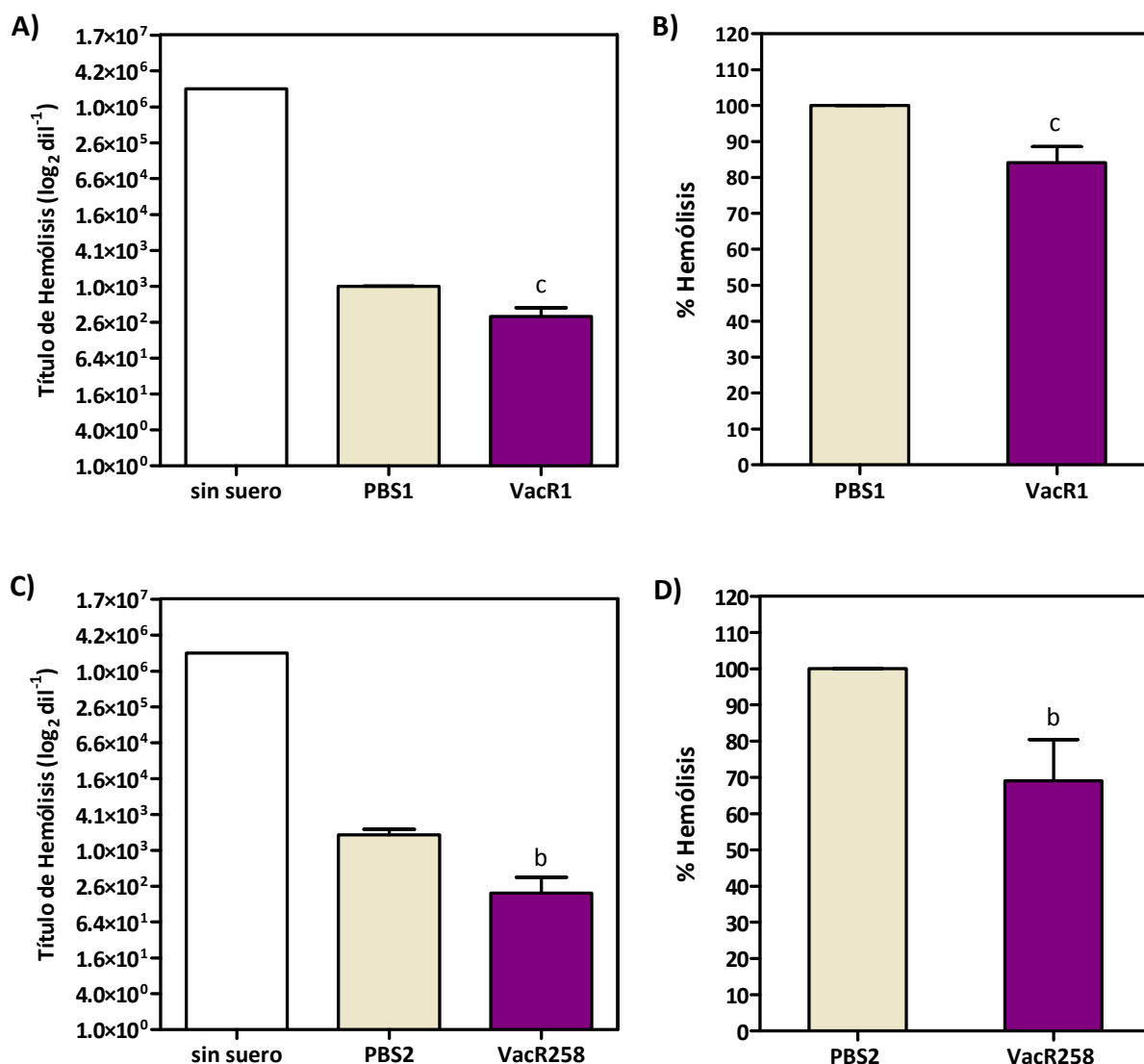


Figura 38. Inhibición de la actividad hemolítica de la nBtox. Diluciones seriadas de la nBtox pre-tratada con los sueros de los animales inmunizados con VacR1 (A) ó VacR258 (C) se enfrentaron a GR de carnero y se determinaron los títulos de hemólisis de la nBtox. Como controles del ensayo emplearon las diluciones de la proteína pre-tratadas con los sueros control ó sin pretratar. Los resultados también se expresaron como los porcentajes de inhibición de la hemólisis (B y D). Se muestran la media ± DE. Las letras indican diferencias significativas respecto de los grupos control (Mann-Whitney, $b < 0,01$; $c < 0,05$).

IV-3-3-2. Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a Fg.

El Fg empleado para este ensayo se extrajo exitosamente a partir de plasma bovino. En el apéndice I se encuentra la imagen de la corrida electroforética realizada para el control de dicha purificación [AI-4].

Como puede verse en la figura 39, las D.O promedio obtenida al enfrentar las bacterias al Fg fue de 0,22 (100% de adherencia). Cuando se pre-incubaban las células con los sueros VacR1 ó VacR258, la adherencia disminuye hasta sólo el 20% y 30%, respectivamente (diferencia significativa respecto del grupo control, $p < 0,05$).

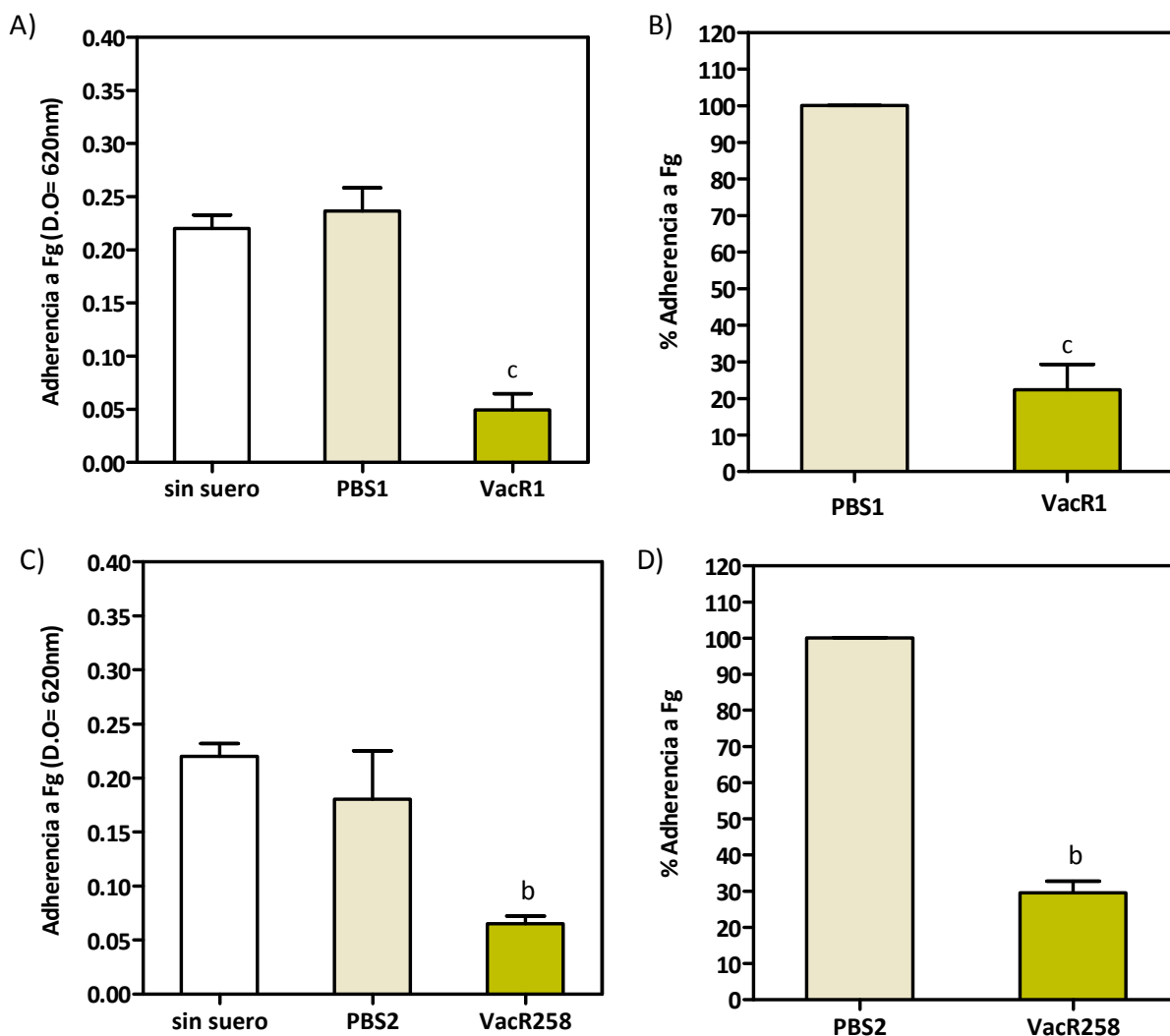


Figura 39. Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a Fg por los sueros VacR1 y VacR258. Se sensibilizaron pocillos de una placa de ELISA con Fg y se agregaron bacterias pre-incubadas con los sueros de animales inmunizados con VacR1 (A y B) ó VacR258 (C y D). Como controles se emplearon bacterias pre-tratadas con sueros PBS1 y PBS2 y sin pre-tratar. El revelado del ensayo se llevó a cabo tiñendo con cristal violeta y midiendo D.O a 620 nm. Los resultados se expresaron como la D.O obtenida (A y C) y como porcentajes de adherencia (B y D). Se muestran la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas respecto de PBS1 y PBS2 (Mann Whitney, $b < 0,01$; $c < 0,05$).

IV-3-3-3. Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a Fn

La incubación de las bacterias con los anticuerpos anti-rFnBP de los animales inmunizados con VacR1 o VacR258, provocaron una disminución de las señales equivalente a una adherencia del 14% y 50%, respectivamente [Figura 40]. Este efecto resultó significativo comparado con el control del ensayo.

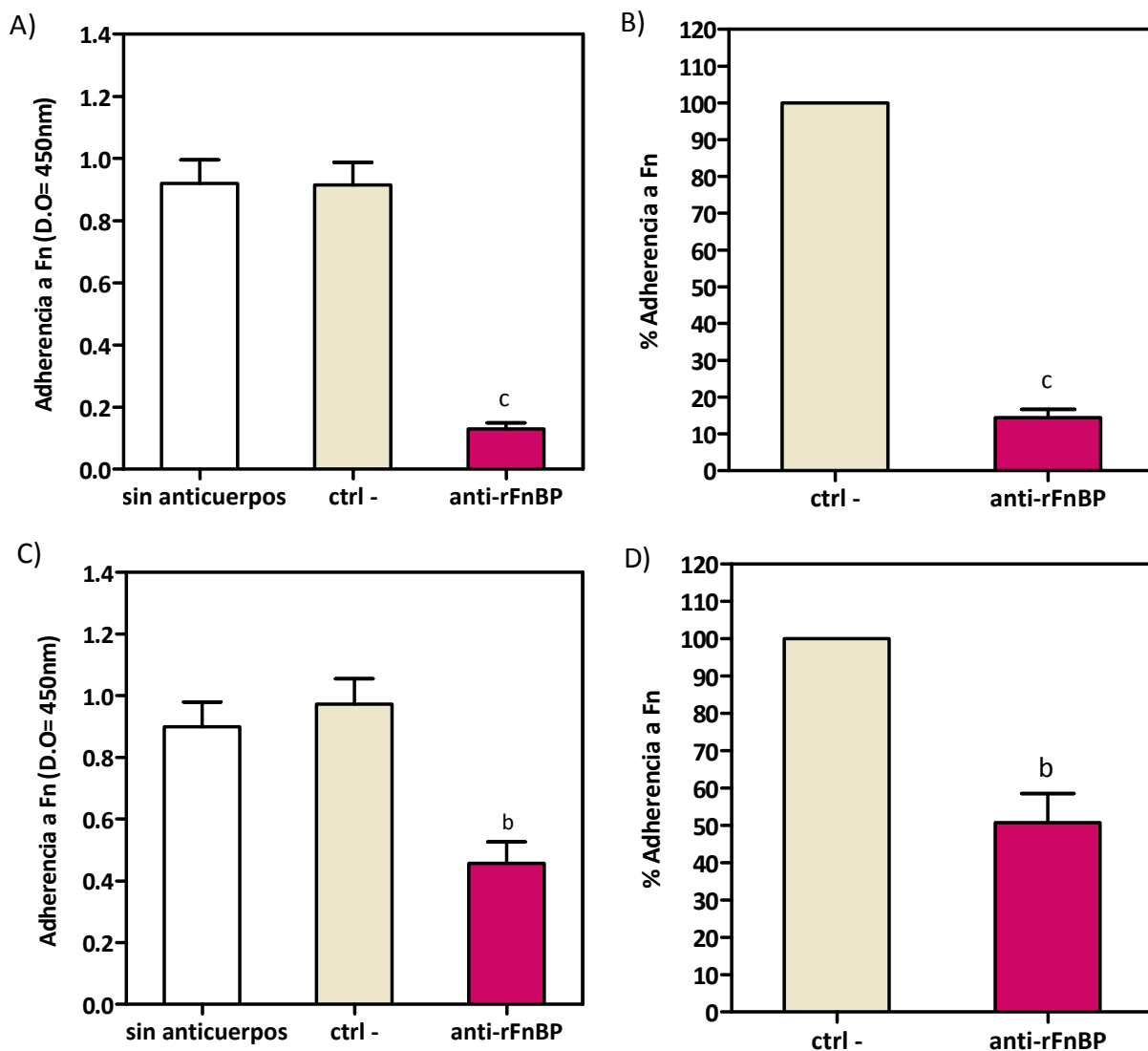


Figura 40. Inhibición de la adherencia de *S. aureus* a Fn por los sueros VacR1 y VacR258. Se realizó un ensayo tipo ELISA, sensibilizando pocillos con Fn y agregando bacterias pre-incubadas con anticuerpos anti-rFnBP purificados a partir de los sueros de animales inmunizados con VacR1 (A y B) ó VacR258 (C y D). Como controles se emplearon bacterias pre-tratadas con anticuerpos anti-rBtox (ctrl-) ó sin pre-tratar. Los resultados se expresaron como las D.Os obtenidas (A y C) y como porcentajes de adherencia (B y D). Se muestran la media ±DE. La letras indican diferencias significativas respecto del ctrl- (Mann Whitney, b< 0,01; c< 0,05).

IV-3-3-4. Capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos séricos.

Se evaluó mediante ensayos *in vitro*, la capacidad de los anticuerpos de opsonizar células de *S. aureus* y favorecer su fagocitosis por PMN bovinos. Las determinaciones se realizaron con los sueros de los grupos VacR1 y PBS1 obtenidos el día +7. La correcta realización del ensayo se verificó mediante microscopía de fluorescencia [Figura 41] y los resultados se analizaron empleando citometría de flujo. Sobre la base de los parámetros de tamaño y complejidad citoplasmática se seleccionó la población conteniendo a los PMN [Figura 42.A]. Sobre la misma, se analizó la incorporación de células de *S. aureus* con marca positiva para FITC en histogramas de escala logarítmica [Figura 42.B].

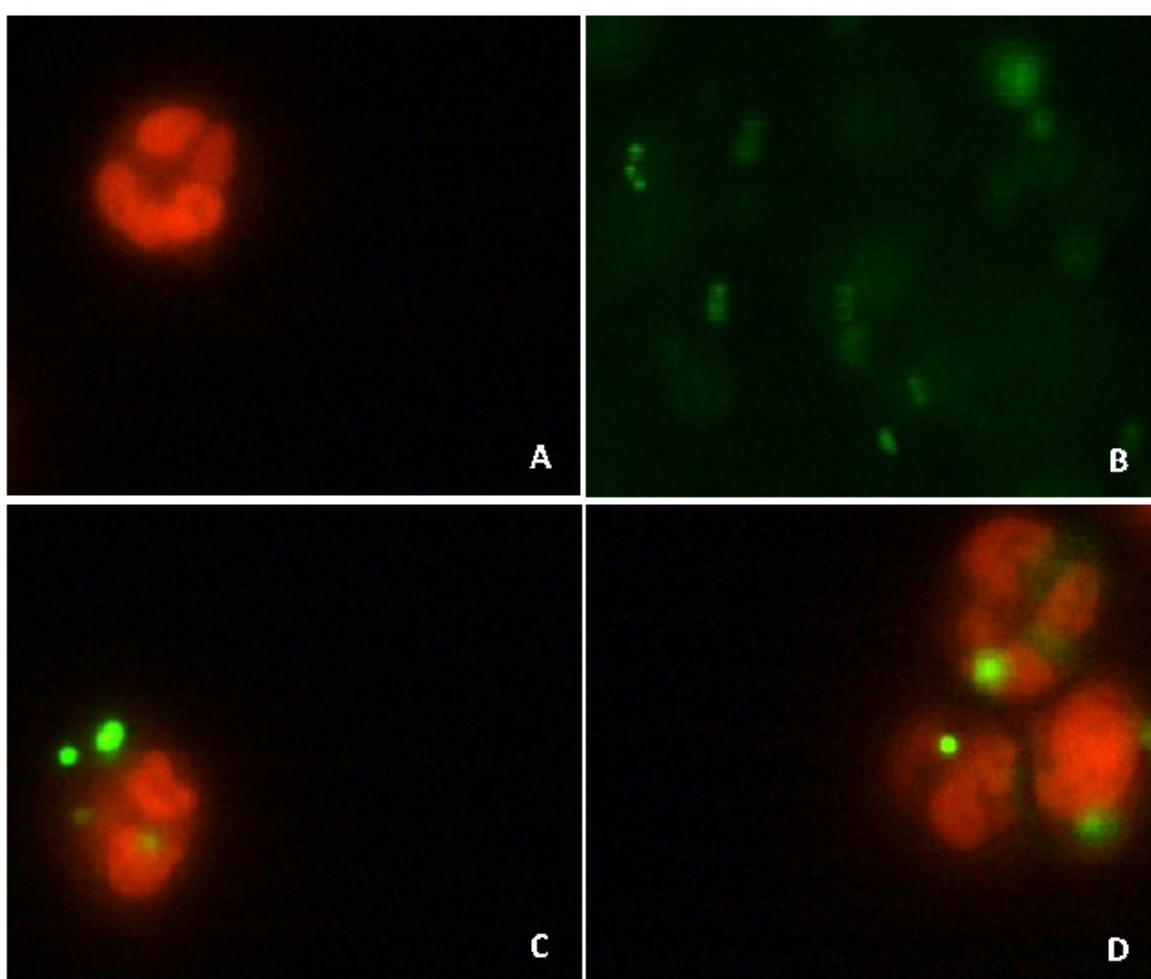


Figura 41. Opsonofagocitosis de *S. aureus* *in vitro* por neutrófilos bovinos. Microscopía de fluorescencia (100X). A) PMN bovino marcado con BrEt. B) *S. aureus* marcado con FITC. C y D) *S. aureus* marcados con FITC fagocitados por PMN bovinos.

Al pre-opsonizar las bacterias con los sueros VacR1, el porcentaje de neutrófilos que presentaron células fagocitadas resultó 30,75 % [Figura 42.C]. Este valor fue unas 2,4 veces mayor al determinado para el grupo PBS ($p < 0.05$). El análisis del parámetro IFM, que permite estimar el número de bacterias ingeridas

por cada PMN positivo, también mostró diferencias significativas entre los dos grupos evaluados ($p < 0,05$) [Figura 42.D].

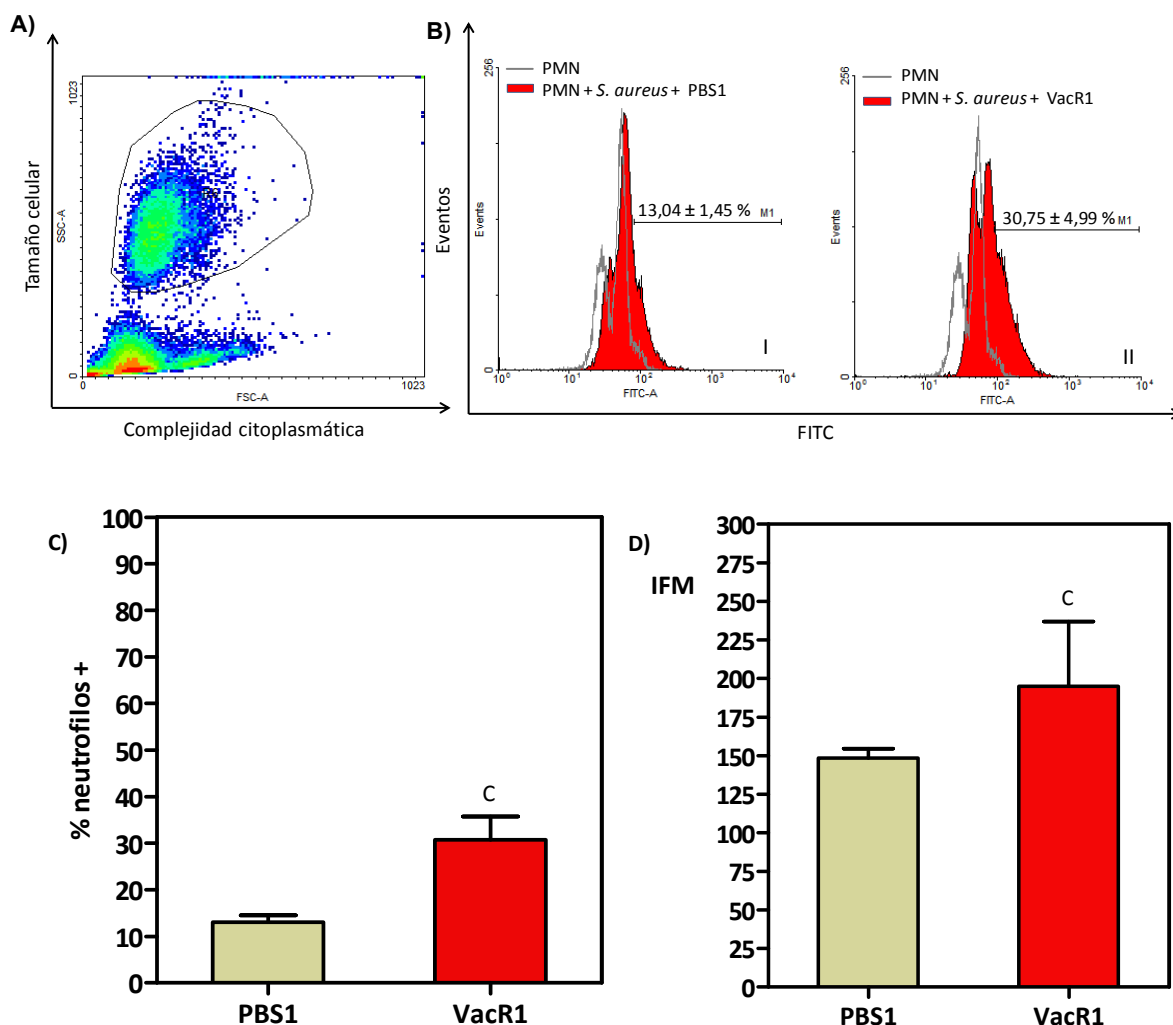


Figura 42. Fagocitosis de *S. aureus* mediada por los sueros VacR1. Neutrófilos bovinos se enfrentaron a células de *S. aureus* (cepa Reynolds) pre-opsonizadas con los sueros de las vaquillonas inmunizadas con VacR1 ó PBS. A) Población seleccionada sobre la base de tamaño *versus* complejidad citoplasmática. B) Histogramas representativos mostrando la intensidad de fluorescencia de PMN al incubarlos con bacterias pre-opsonizadas con los sueros de los grupos PBS1 (I) ó VacR1 (II). Los resultados se muestran expresados como porcentaje de neutrófilos (C) e índice de fluorescencia media, IFM (D). Se muestran las medias \pm DE. ^C Diferencias significativas respecto de PBS1 (Mann Whitney; $p < 0,05$).

IV-3-3-5. Inhibición de la invasión de células epiteliales mamarias bovinas

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos de leche de inhibir la internalización de *S. aureus* en células MAC-T. La pre-incubación de *S. aureus* con los sueros del grupo inmunizado con VacR1 dio un 17,5 % de bacterias internalizadas; mientras que para el grupo VacR258 el porcentaje fue 22,04% [Figura 43]. Estos

valores fueron significativamente superiores a los obtenidos con los sueros de los grupos controles ($p < 0,05$).

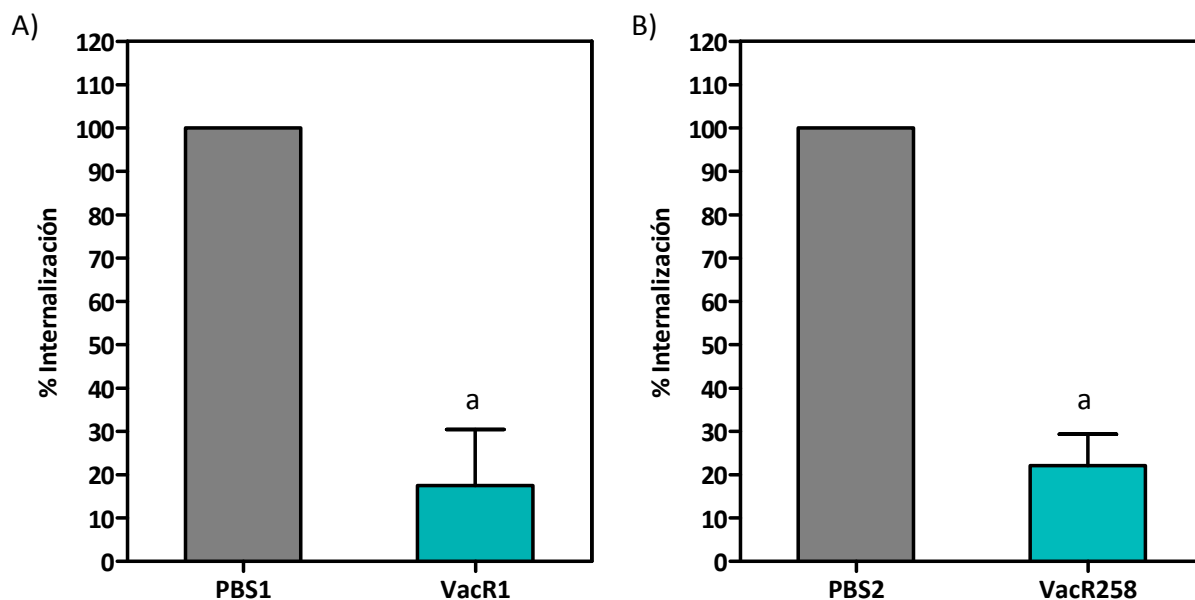


Figura 43. Inhibición de la internalización de *S. aureus* en células MAC-T por los anticuerpos de leche. Pre-opsonización de células de la cepa Reynolds de *S. aureus*, con las muestras de leche de los grupos inmunizados o control, extraídos el día +7. Luego se co-cultivaron con las células MAC-T y se determinaron los porcentajes de internalización, considerando 100% al valor obtenido para los sueros control. A) Resultados obtenidos para VacR1. B) Resultados obtenidos para VacR258. Se muestra la media \pm DE. ^aDiferencias significativas respecto del grupo PBS1 y PBS2 (Mann Whitney, $p < 0,001$).

IV-4. DISCUSIÓN

Los avances en el conocimiento de los mecanismos de virulencia de *S. aureus* y los numerosos antecedentes en el desarrollo de vacunas contra la bacteria, han llevado a los investigadores del tema a acordar que la vacuna ideal contra *S. aureus* debe ser multicomponente [Middleton, 2008; Anderson y col., 2012; Pozzi y col., 2012]. Entre las distintas alternativas de vacunas, los inmunógenos a subunidades basados en la tecnología del ADN recombinante, son los que han ofrecido hasta el momento un mejor desempeño en la defensa contra la bacteria [Pereira y col., 2011]. Sin embargo, hay escasos estudios realizados en bovinos y ninguno de ellos aplica estrategias de vacunación empleando sólo proteínas recombinantes. De allí surgió como objetivo de esta tesis, desarrollar un inmunógeno multicomponente que incluya proteínas recombinantes de *S. aureus* para combatir las IIM causadas por dicha bacteria. De acuerdo a la hipótesis de trabajo planteada, se seleccionaron antígenos bacterianos involucrados en distintos mecanismos de virulencia, con el fin de otorgar protección a distintos niveles del proceso de infección. En base a esto, la formulación se compone de las moléculas de adhesión ClfA y FnBPA, la hemolisina Btox, la proteína metabólica IsdH y los polisacáridos capsulares CP5 y CP8. ClfA y FnBPA cumplen roles fundamentales en la adherencia e invasión de la glándula mamaria durante los primeros estadios de las IIM [Nordhaug y col., 1994a; Joh y col., 1999; Hensen y col., 2000]. Btox, es secretada por la bacteria para causar daños en el hospedador, una vez que logra establecer la infección [Anderson, 1976; Nordhaug y col., 1994a; Sutra y Poutrel, 1994]. IsdH, tiene importancia en la supervivencia de la bacteria en la glándula mamaria en estadio de lactancia (cuando en presencia de leche la disponibilidad de hierro es limitada para la bacteria) [Ster y col., 2010; Pishchany y Skaar, 2012]. Finalmente, los polisacáridos, dificultan la fagocitosis de las bacterias, constituyendo un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador [Fattom y col., 1998; O’Riordan y Lee, 2004].

El adyuvante empleado en este trabajo, fue ISCOM- matrix, el cual fue seleccionado por su capacidad para estimular respuestas humorales/celulares balanceadas y robustas, que ofrecerían un mayor potencial para combatir las infecciones por bacteria difíciles, como *S. aureus*. En una publicación reciente, realizada en el marco del proyecto relacionado a esta tesis, se llevó a cabo un estudio comparativo del desempeño de ISCOM-matrixTM y el adyuvante Hidróxido de aluminio (de uso común en vacunas veterinarias). Se inmunizaron vaquillonas con una bacterina de *S. aureus*, formulada con cada uno de los adyuvantes y se evaluaron las respuestas inmunes obtenidas [Camussone y col., 2013b]. Los resultados verificaron la potencia de ISCOM-matrixTM como adyuvante, el cual superó significativamente al adyuvante tradicional, en cuanto a los niveles de anticuerpos en sangre y leche y a la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos [Camussone y col., 2013a]. En un trabajo posterior, también se

evidenció la capacidad de ISCOM-matrix de inducir un perfil celular en vaquillonas inmunizadas contra *S. aureus*, ya sea empleando una bacterina o un lisado bacteriano [Camussone y col., 2014a].

En el presente capítulo, se llevó a cabo un primer ensayo empleando la formulación VacR1, que incluía las tres primeras proteínas obtenidas: rBt, rClf y rFnBP. Este se planeó como una prueba preliminar para evaluar la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes en bovinos. Posteriormente, se diseñó el segundo ensayo para evaluar la formulación de interés, VacR258, a la cual se incorporaron la proteína rIldH y CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}. En ambos casos se evaluaron las respuestas humorales obtenidas, en cuanto a amgnitud y funcionalidad, para determinar el potencial protectoro contra las IIMs bovinas causadas por *S. aureus*.

Las formulaciones multicomponentes VacR1 y VacR258, resultaron inmunogénicas en bovinos al aplicarlas en dos dosis subcutáneas en el nodo linfoide supramamario, a los -45 y -15 días pre-parto. Los antígenos recombinantes, fueron capaces de generar anticuerpos sanguíneos que se mantuvieron elevados en el tiempo, al menos hasta el día +60. A pesar de que no hay antecedentes en la inmunización de bovinos con proteínas recombinantes, los resultados reportados previamente por Nour El-Din y col. reflejan el potencial inmunogénico de este tipo de moléculas [Nour El-Din y col., 2006]. En dicho trabajo, aplican una estrategia de vacunación de bovinos combinando tres dosis de plásmidos codificantes para ClfA, seguidas de una cuarta dosis de proteína recombinante. La administración de la dosis proteica, generó mayores niveles de anticuerpos y de larga duración, comparado con los obtenidos luego de las inmunizaciones a DNA [Nour El-Din y col., 2006]. Los conjugados CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ}, dieron una respuesta humoral de menor duración, con niveles de anticuerpos significativamente superiores al grupo control hasta el día +15. En otros trabajos previamente publicados, los autores reportan respuestas humorales de mayor duración [O'Brien y col., 2000; Tollersrud y col., 2001]. Por ejemplo, O'Brien y col. (2000), estudiaron la respuesta inducida por la mezcla de tres conjugados basados en los polisacáridos CP5, CP8 y 336, preparados por la técnica de la carbodiimida y empleando la enterotoxina recombinante de *Pseudomona aeruginosa* (rEPA) como proteína transportador. La inmunización de vacas en lactancia, con dos dosis subcutáneas de 100 µg ó 200 µg totales de polisacáridos conjugados, formulados con adyuvante FIA, produjeron aumentos en los niveles de anticuerpos, los cuales se mantuvieron significativamente superiores a los valores pre-inmunes hasta aproximadamente la semana 12 de ensayo [O'Brien y col., 2000]. Tollersrud y col. (2001) evaluaron la respuesta inmune generada por un conjugado CP5-ASH, preparado por una técnica de aminación reductiva y formulados con el adyuvante oleoso Montanide ISA 70TM. Los autores informaron sobre la inmunización de vacas lecheras, con 2 dosis subcutáneas de 200 µg de CP5, seguido de un refuerzo a los 11 meses de la segunda dosis. El conjugado resultó efectivo en inducir una respuesta de anticuerpos en suero, de larga duración durante más de 300 días [Tollersrud y col., 2000]. En otro estudio llevado a

cabo por Gilbert y col. (1994), la inmunización de vaquillonas en lactancia con 2 dosis subcutáneas, de 200 μ g de CP5 conjugado a ovoalbúmina y formulado con FIA, logró inducir altos niveles de anticuerpos detectables hasta aproximadamente 250 días luego de la primera dosis. Como puede observarse, los conjugados empleados en los distintos trabajos difieren entre sí y de CP5(8)-ASH_{PBQ}, en cuanto a los métodos de conjugación, a las proteínas transportadoras, las rutas de administración, el estadio fisiológico de los animales y los adyuvantes empleados. Todas estas son variables que influyen tanto en las propiedades inmunogénicas de los polisacáridos conjugados y en la capacidad de respuesta del sistema inmune de los bovinos [Fattom y col., 1995a] Las evaluaciones realizadas en ratones con el conjugado CP5-ASH_{PBQ} [capítulo II-3], permitieron verificar que la estrategia de conjugación seleccionada potencia significativamente la inmunogenicidad de los polisacáridos de *S. aureus*, generando una respuesta humoral robusta. Entonces, una explicación a los bajos niveles de anticuerpos obtenidos en el modelo bovino, podría ser atribuida a que la dosis administrada en este modelo no ha sido adecuada. La cantidad de 300 μ g de cada polisacárido por dosis, se calculó de manera de no superar los 2 mg de proteínas totales por dosis, considerando los 4 antígenos proteicos de *S. aureus* y la ASH conjugada a los polisacáridos. Si bien esta cantidad es superior a los 100-200 μ g/dosis reportados en trabajos previos [Gilbert y col., 1994; O'Brien y col., 2000; Tollersrud y col., 2001], debe tenerse en cuenta que no existen dosis de polisacáridos sugeridas para la inmunización de rumiantes, por lo que los autores las definen empíricamente o en base a antecedente previos [Gilbert y col., 1994; Tollersrud y col., 2001]. De acuerdo a lo previamente comentado, debería optimizarse la dosis a administrar de cada conjugado en particular y según el protocolo de vacunación a emplear, para asegurar el éxito de la inmunización.

Los picos de anticuerpos sanguíneos obtenidos para ambos inmunógenos (VacR1 y VacR258), se caracterizaron por altos títulos de IgG_{total} e IgG₂. En otros trabajos de evaluación de inmunógenos contra la mastitis bovina casuada por *S. aureus* se reportaron incrementos significativos de la subclase IgG₂. En este sentido, Nour El-Din y col. (2006) observaron un incremento significativo de los niveles de IgG₂ en sangre, luego de administrar una dosis refuerzo de ClfA recombinante en bovinos previamente vacunados con ADN (codificante para ClfA). Incluso, en varios trabajos, informaron que IgG₂ resulta la subclase predominante sobre IgG₁ al inmunizar bovinos con distintos tipos de inmunógenos, como vacunas a ADN, células de *S. aureus* inactivadas o polisacáridos de la bacteria conjugados [Gilbert y col., 1994; Shkreta y col., 2004; Nour El-Din y col., 2006; Pellegrino y col., 2010]. En el presente estudio, no se midió IgG₁ en sangre, dado que las determinaciones se realizaron el día +7 respecto al parto.

En investigaciones recientes realizadas por Potter (2011) y Kociņa y col. (2012) se ha reportado sobre la cinética de la IgG₁, quienes describen que desde 2-3 semanas previas al parto hasta unas semanas posteriores, la subclase disminuye marcadamente en sangre debido a que es transportada a la glándula mamaria durante la calostrogénesis para ofrecer protección frente a infecciones latentes. En cambio, la

IgG₂ se mantiene en el torrente sanguíneo y es reclutada a la glándula mamaria durante las infecciones bacterianas [Paape y col., 2002]. Dado el rol opsónico de esta subclase para los PMN bovinos, los altos niveles de IgG₂ producidos por VacR1 y VacR258, revelan el potencial de estos inmunógenos de promover la fagocitosis de *S. aureus*, principal mecanismo de defensa contra la bacteria.

Las cinéticas de producción de anticuerpos en leche, obtenidos para todos los antígenos de VacR1 y VacR258 muestran máximos niveles el día +7, en coincidencia con los resultados hallados en sangre, y luego decaen rápidamente. Este comportamiento es propio de la cinética en leche, ya que en ausencia de infección bacteriana no hay un reclutamiento constante de anticuerpos desde la periferia [Smith y Hoogan, 2001]. Por lo tanto, a medida que aumentan las secreciones lácteas en la glándula mamaria durante el período de lactancia, la concentración de inmunoglobulinas decrece marcadamente respecto del período pre-parto [Smith y Hoogan, 2001; Burton y Erskine, 2003].

En el presente estudio, los resultados revelan altos niveles de IgG₁ en leche contra todos los componentes de ambas vacunas. La subclase IgG₁ es predominante en ubres sanas luego del parto [Sordillo, 2005]. Dado que esta subclase es principalmente opsónica para los macrófagos residentes [Barrio y col., 2003], la preexistencia de IgG₁ específica contra *S. aureus* en la glándula mamaria, contribuiría a la defensa del hospedador durante el comienzo de la infección, mientras se reclutan neutrófilos y anticuerpos IgG₂ desde el torrente sanguíneo.

Por otro lado, la subclase IgG₂ se encontró en cantidades significativas en leche en respuesta a los antígenos proteicos de VacR258. Debido a que la IgG₂ no está normalmente presente en las glándulas mamarias de animales sanos [Caffin y Poutrel, 1988; Nordhaug y col., 1994a], los resultados sugieren que las proteínas de VacR258 generan una respuesta humoral lo suficientemente robusta, como para favorecer el transporte de IgG₂ desde la sangre a la leche. En cambio, los menores títulos de IgG₂ sanguínea obtenidos contra CP5 y CP8, se asociaron a la ausencia de dicha subclase en las muestras de leche. Esto pone nuevamente en evidencia, la necesidad de optimizar la dosis de conjugados, para mejorar la respuesta humoral generada contra los polisacáridos capsulares de *S. aureus*. Cabe mencionar además, que a pesar de los altos niveles de IgG₂ sanguínea obtenidos en el grupo inmunizado con VacR1, no se detectó esta subclase en las muestras de leche. Teniendo en cuenta que esta formulación comparte los tres antígenos con VacR258 (rBtox, rClf y rFnBP), es probable que la falta de señal específica se deba al deterioro en la calidad de las muestras debido al paso del tiempo (2 años desde las tomas de muestra), que produjeron interferencias en el ensayo de ELISA. Debe recordarse, que el transporte de IgG₂ hacia la glándula mamaria en el contexto de una IIM, produce incrementos en la concentración de esta subclase en leche de entre 3-5 y hasta 10 veces respecto de una ubre sana [Korhonen y Kaartinen, 1995; Sandholm y Korhonen, 1995]. Por lo tanto, los resultados sugieren que los altos niveles de IgG₂ preexistentes a una infección, logrados al vacunar los bovinos con los inmunógenos

VacR1 y VacR258, asegurarían el transporte inmediato a la glándula mamaria permitiendo combatir de manera más temprana y eficiente al patógeno [Colditz y Watson, 1985].

Para evaluar el desempeño de las respuestas humorales obtenidas contra VacR1 y VacR258 frente a los distintos mecanismos de virulencia de la bacteria, se llevaron a cabo ensayos de funcionalidad de los anticuerpos. Los ensayos de hemólisis demostraron que los anticuerpos generados contra la rBtox son capaces de reconocer a la forma nativa de la proteína y neutralizarla contribuyendo a disminuir significativamente la lisis de los GR. Debido a la falta de antecedentes en el uso de Btox de *S. aureus* recombinante para la formulación de inmunógeno destinados a la prevención de la mastitis bovina [Pereira y col., 2011], se desconocía hasta el momento, si los anticuerpos anti-Btox eran eficientes para bloquear la actividad de la proteína. Incluso, los trabajos publicados en los que emplean inmunógenos formulados con hemolisinas de *S. aureus* purificadas a partir de cultivos de la bacteria, no realizan estudios funcionales de los anticuerpos [Watson, 1992; Nickerson y col., 1993; Nordhaug y col., 1994a; b; Hwang y col., 2000]. Durante una infección por *S. aureus*, esta respuesta funcional dirigida contra la Btox en los animales inmunizados, contribuiría a disminuir el daño causado por este patógeno. Por lo tanto, los ensayos de hemólisis realizados en el presente estudio, aportan resultados originales que sugieren a rBtox como un inmunógeno candidato para la formulación de vacunas contra la mastitis bovina.

Se evaluó también la capacidad de los anticuerpos anti-rClf y anti-rFnBP de bloquear la unión de ClfA y FnBPA nativas a sus ligandos. Está ampliamente reportado que los anticuerpos murinos generados contra adhesinas recombinantes son funcionales [Ciborowski y col., 1992; Schennings y col., 1993; Huesca y col., 2000; Gong y col., 2010; Hawkins y col., 2012], pero no hay antecedentes de este tipo de evaluación con anticuerpos bovinos. Los anticuerpos generados, tanto con VacR1 como con VacR258, contribuyeron a disminuir significativamente la adherencia de *S. aureus* a Fg y Fn, dando porcentajes comparables a los reportados en modelos murinos, en los cuales es más fácil de lograr respuestas inmunes más robustas [Schennings y col., 1993; Brouillette y col., 2003a; Hawkins y col., 2012]. En un trabajo recientemente publicado, relacionado al proyecto en el cual se enmarca esta tesis, se inmunizó un grupo de vaquillonas con un lisado de *S. aureus* (grupo Lis) y un segundo grupo con el lisado suplementado con las tres moléculas recombinantes rClf, rFnBP y rBtox (grupo Lis+Rec) [Camussone y col., 2014b]. Los sueros Lis+Rec generaron mayores porcentajes de inhibición de la adherencia a Fn y Fg, comparado con el grupo Lis [Camussone y col., 2014b]. Esta observación coincide con los hallazgos reportados por otros autores, acerca de las deficiencias de las moléculas nativas para estimular la generación de anticuerpos funcionales [Higgins y col., 2006; Hawkins y col., 2012].

La inhibición de la unión bacteriana a las proteínas de la matriz endotelial, como Fg y Fn, contribuiría a bloquear la invasión de los tejidos durante los primeros estadios de la infección [Nordhaug y col.,

1994a]. Para verificar si los anticuerpos generados con VacR1 y VacR258 poseen esta capacidad, se llevaron a cabo ensayos de adherencia e internalización de *S. aureus* a células MACT-T, pre-incubando la bacteria con los sueros de leche. En el presente trabajo se determinó una alta eficiencia de los anticuerpos para inhibir la invasión bacteriana. Sin embargo, los resultados reportados en otros trabajos son discordantes. Shkreta y col. (2004) no observaron un efecto inhibitorio sobre la adherencia de *S. aureus* a MAC-T, al pre-tratar las bacteria con sueros de leche de los animales inmunizados contra ClfA y FnBPA mediante la combinación de dosis a ADN y proteínas [Shkreta y col., 2004]. Contrariamente a lo reportado por Shkreta y col. (2004), y en acuerdo con los resultados aquí obtenidos, Nour El-Din y col. (2006) informaron una disminución significativa de la adherencia, al emplear sueros de bovinos inmunizados sólo contra ClfA mediante la estrategia de vacunación ADN + proteína. Estas diferencias observadas entre estudios podrían deberse a la expresión diferencial de los antígenos de *S. aureus* influenciada por las condiciones de cultivo y a la redundancia de los mecanismos de adherencia bacteriana [Sinha y Fraunholz, 2010]. A su vez, resaltan la necesidad de desarrollar formulaciones multicomponentes, diseñadas de manera de interferir con las diversas estrategias de supervivencia de la bacteria.

La inhibición de la adherencia e internalización al tejido mamario contribuiría a mantener las bacterias expuestas a la acción de las células fagocíticas y/o favorecer la eliminación de las mismas [Nour El-Din y col., 2006]. La fagocitosis por neutrófilos bovinos, es el principal mecanismo de defensa contra *S. aureus* en la glándula mamaria, y los anticuerpos IgG₂ tienen un rol determinante en este proceso [Paape y col., 2000; Burton y Erskine, 2003]. Tanto los neutrófilos como los anticuerpos que intervienen en la inmunidad de la glándula mamaria, provienen de la sangre y resultan del reclutamiento en presencia de una IIM [Burton y Erskine, 2003]. Por esto, en el presente estudio se decidió evaluar la capacidad opsonofagocítica de los anticuerpos sanguíneos, como forma de estimar el potencial protector que tendrán una vez desarrollada la respuesta humoral en la glándula mamaria frente a una infección por *S. aureus*. El ensayo *in vitro* mostró una fagocitosis aumentada en el grupo VacR1 respecto del control, resultando dicha diferencia significativa. Estos resultados coinciden con los antecedentes que reportan que los anticuerpos anti-ClfA y anti-FnBPA son opsonofagocíticos [Higgins y col., 2006; Zhou y col., 2006] y con los altos títulos de IgG₂ obtenidos en sangre. Según lo descrito en la bibliografía, durante la migración de los neutrófilos hacia el tejido mamario, hay una regulación positiva de la expresión de los receptores Fc para IgG₂ [Burton y Erskine, 2003], lo que sugiere que en la glándula mamaria la actividad fagocítica estaría incrementada respecto a lo observado en sangre. En el ensayo realizado en la presente investigación se empleó la cepa Reynolds de *S. aureus*, capaz de expresar el polisacárido capsular tipo 5 [Karakawa y Vann, 1982] que ofrece resistencia a la fagocitosis [O'Riordan y Lee, 2004]. Diversos autores han demostrado el antifagocítico de la cápsula al enmascarar las adhesinas de la superficie bacteriana [O'Riordan y Lee, 2004; Risley y col., 2007]. El enmascaramiento impediría el reconocimiento de las

adhesinas por parte de los anticuerpos específicos, interfiriendo con la opsonización de la bacteria y posterior fagocitosis [Risley y col., 2007; Schaffer y Lee, 2008]. Sin embargo, en presencia de anticuerpos específicos, se contrarresta el efecto antifagocítico de las cápsulas y la bacteria es eficientemente fagocitada [Thakker y col., 1998; O'Riordan y Lee, 2004]. Por esta razón, se incluyeron los CP5 y CP8 de *S. aureus* a la formulación multicomponente VacR258. Se esperaba que los anticuerpos específicos dirigidos contra los distintos componentes vacunales, contribuyeran conjuntamente a aumentar la fagocitosis de la bacteria respecto de VacR1. Si bien se realizaron ensayos de fagocitosis de *S. aureus* mediada por suero VacR1, resta aún realizar en el futuro ensayos de fagocitosis con el grupo VacR258 para definir la importancia de incluir a rIsdH, CP5 y CP8 en la formulación. Cabe mencionar, que los títulos de IgG₂ sanguínea obtenidos para el grupo VacR258, fueron significativamente menores a los del grupo VacR1. Por lo tanto, los resultados de un ensayo de fagocitosis con los grupos VacR1 y VacR258 serían interesantes para determinar si dichas diferencias en los niveles de IgG₂ se asocian a diferencias en la capacidad de los sueros de promover la fagocitosis de la bacteria. Respecto a esto, algunos trabajos previos, reportan que los porcentajes de fagocitosis no se correlacionan con los niveles de esta subclase y parecería que sólo se necesitan cantidades mínimas de IgG₂ específica para contribuir a la eliminación de *S. aureus* por PMN bovinos [O'Brien y col., 2000; Pellegrino y col., 2010].

La inmunización de vaquillonas preñadas con ambos inmunógenos, logró desencadenar una respuesta humoral robusta a lo largo de las primeras semanas post-parto, período de mayor susceptibilidad a adquirir IIM. Esta respuesta fue capaz de bloquear los principales mecanismos de virulencia de *S. aureus* y de contribuir a la fagocitosis, de importancia fundamental para la eficiente eliminación de la bacteria de la glándula mamaria. A pesar de que la evaluación de VacR1 se llevó a cabo como un ensayo preliminar para determinar la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes, los resultados obtenidos en este capítulo, demuestran que tanto VacR1 como VacR258 constituyen potenciales candidatos a vacunas contra las IIM bovinas causadas por *S. aureus*.

IV-5. Conclusiones parciales

- Las proteínas recombinantes rClf, rFnBP, rBtox y rIsdH, generaron altos títulos de IgG_{total} e IgG₂ en sangre y niveles significativos de IgG₁ en leche. Sólo pudo detectarse la subclase IgG₂ específica en las muestras de leche del grupo VacR258.
- Los conjugados CP5(8)-ASH_{PBQ} resultaron inmunogénicos en bovinos, induciendo una marcada respuesta de anticuerpos en sangre, con presencia de niveles significativos de la subclase IgG₂. Sin embargo, en leche sólo estimularon la producción de IgG₁ en niveles bajos, aunque significativos respecto de los controles.
- Los anticuerpos generados contra rBtox, rClf y rFnBP reconocieron específicamente sus moléculas blanco expresadas por la bacteria, resultando altamente funcionales. Los anticuerpos anti-rBtox tuvieron un efecto neutralizante significativo sobre la toxina nativa de *S. aureus*. Mientras que los anticuerpos anti-rClf y anti-rFnBP bloquearon efectivamente la adherencia de *S. aureus* a Fg y Fn plasmáticos, mecanismo fundamental durante la invasión de los tejidos.
- VacR1 como VacR258 constituyen potenciales candidatos a vacunas contra las IIM bovinas causadas por *S. aureus*, teniendo en cuenta que ambas formulaciones multicomponentes, generaron respuestas humorales significativas contra todos los componentes de ambos inmunógenos, durante el período de mayor susceptibilidad a adquirir IIM. Dichas respuestas humorales, resultaron efectivas para bloquear la internalización de *S. aureus* al tejido epitelial mamario, paso crucial para el inicio del proceso de infección, y mostrando un alto potencial para reducir los daños causados por la bacteria en el hospedador. La formulación VacR1 demostró además, que es capaz de promover la fagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos, principal mecanismo de defensa contra la bacteria.

Conclusiones generales

En esta tesis se aplicó un criterio racional para el desarrollo de una vacuna multicomponente contra *S. aureus*, el cual se basó en seleccionar distintos antígenos de esta especie bacteriana que intervengan en los principales mecanismos de virulencia que la bacteria utiliza durante los diferentes estadios de la infección, con el objetivo de impedir el establecimiento de la enfermedad.

En primer lugar, se desarrollaron conjugados CP5(8)-ASH_{PBQ}, mediante una técnica que emplea PBQ. Los conjugados CP5(8)-ASH_{PBQ} desarrollados mediante la técnica basada en PBQ demostraron capacidad de estimular en un modelo murino, la producción de altos niveles de anticuerpos, de todas las subclases (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃) y de generar memoria inmunológica, las cuales constituyen características de una respuesta humoral potencialmente capaz de combatir las infecciones causadas por *S. aureus*. De esta manera, se puede concluir que la conjugación de CP5 y CP8 empleando PBQ, es una metodología sencilla, robusta y económica, que refuerza significativamente las propiedades inmunogénicas de los polisacáridos de *S. aureus*, convirtiendo así a los conjugados CP5(8)-ASH_{PBQ} en candidatos prometedores para su inclusión en vacunas a subunidades destinadas a controlar las infecciones causadas por la bacteria.

Posteriormente, los antígenos proteicos, rBtox, rClf, rFnBP y rIsdH, seleccionados para la formulación de la vacuna multicomponente fueron obtenidos exitosamente, con buenos rendimientos y alta pureza, lo cual facilitaría el futuro escalamiento de la producción como componentes vacunales. La capacidad inmunogénica demostrada por los 4 antígenos recombinantes, estimulando marcadas respuestas humorales en ratones, incluso al administrarlos en bajas concentraciones, resulta de relevancia para el desarrollo de formulaciones multicomponentes, basado en la incorporación de múltiples antígenos minimizando la dosis.

La respuesta humoral generada en bovinos por los dos inmunógenos multicomponentes VacR1 (rBtox, rClf y rFnBP) y VacR258 (rBtox, rClf y rFnBP, rIsdH, CP5-ASH_{PBQ} CP8-ASH_{PBQ}) fue relevante considerando el mayor título de anticuerpos IgG_{total} e IgG₂ observado el día 7 post-parto, acompañado por la presencia de niveles significativos de anticuerpos en leche. Las moléculas proteicas recombinantes resultaron más inmunogénicas que los polisacáridos CP5 y CP8 conjugados. En este sentido, se evidenció mayores niveles de anticuerpos anti-proteínas, de mayor duración y presencia de las subclases IgG₁ e IgG₂ en leche, mientras que la respuesta humoral dirigida contra los polisacáridos fue menor, de corta duración y sólo la subclase IgG₁ fue detectable en muestras de leche.

El análisis conjunto de los resultados obtenidos al inmunizar ratones y vaquillonas con polisacáridos conjugados, sugieren que debería optimizarse la dosis aplicada en bovinos para lograr una respuesta humoral robusta.

Las formulaciones evaluadas resultaron altamente inmunogénicas bovinos, constituyendo antígenos potenciales para la formulación de vacunas contra la mastitis bovina causada por *S. aureus*.

Un aspecto destacado alcanzado en el marco de esta investigación fue el bloqueo eficiente de las funciones de las moléculas proteicas por reacción cruzada de los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes con las correspondientes moléculas nativas expresadas por la bacteria, mediante ensayos de funcionalidad. A través del bloqueo de la adherencia de *S. aureus* a Fn y Fg, se logró inhibir la invasión del tejido epitelial mamario por la bacteria, primer paso en el desarrollo de la infección. Además, los anticuerpos generados contra rBtox neutralizaron eficientemente la actividad hemolítica de la proteína nativa sobre GRs de carnero, y por ende, representan anticuerpos con potencialidad en la capacidad de protección frente a los daños causados por la bacteria. A su vez, la inmunización con VacR1 contribuyó a aumentar la fagocitosis de *S. aureus* por PMN bovinos, mecanismo primordial para la eliminación eficiente de la bacteria de la glándula mamaria.

Esta tesis constituye el primer antecedente en la aplicación de estrategias de inmunización de bovinos basada exclusivamente en proteínas recombinantes. Tanto VacR1 como VacR258 generaron respuestas humorales robustas, que aseguran la presencia de altos niveles de anticuerpos específicos en sangre y leche, durante el período de mayor susceptibilidad a adquirir infecciones por *S. aureus*. Estos resultados, sustentan la hipótesis planteada, ya que el direccionamiento de la respuesta inmune hacia diferentes factores de virulencia de *S. aureus*, fue capaz de interferir con mecanismos claves que se desencadenan durante el desarrollo de una infección, a la vez que contribuyó a fortalecer los mecanismos de defensa contra la bacteria. Finalmente, esta investigación demuestra que ambos inmunógenos ofrecen un gran potencial para proteger contra las infecciones causadas por *S. aureus*, por lo que constituyen candidatos prometedores a seguir evaluando como vacunas destinadas al control de la mastitis bovina causada por este patógeno.

Bibliografía

- Aarestrup, F.M.;Larsen, H.D.;Eriksen, N.H.;Elsberg, C.S. y Jensen, N.E. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 107: 425-430.
- Adhikari, R.P.;Karauzum, H.;Sarwar, J.;Abaandou, L.;Mahmoudieh, M.;Boroun, A.R.y col. 2012. Novel structurally designed vaccine for *S. aureus* alpha-hemolysin: protection against bacteremia and pneumonia. *PloS one* 7: e38567.
- Almeida, R.A.;Matthews, K.R.;Cifrian, E.;Guidry, A.J. y Oliver, S.P. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science* 79: 1021-1026.
- Alluwaimi, A.M. 2004. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Research in veterinary science* 77: 211-222.
- Ambroggio, M.B. 2012. In Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Ambroggio, M.B. 2013. Relevamiento de tipos capsulares de *S. aureus* aislados de mastitis bovina de Argentina, Chile y Uruguay. Tesina de grado para optar al título de Lic. en Biotecnología. Universidad Nacional del Litoral.
- Anderson, A.S.;Miller, A.A.;Donald, R.G.;Scully, I.L.;Nanra, J.S.;Cooper, D.y col. 2012. Development of a multicomponent *Staphylococcus aureus* vaccine designed to counter multiple bacterial virulence factors. *Human vaccines & immunotherapeutics* 8: 1585-1594.
- Anderson, C. 2000. Production and delivery of recombinant subunit vaccines. . Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden. ISBN 91-7170-633-X.
- Anderson, J.C. 1976. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *The British veterinary journal* 132: 229-245.
- Anderson, J.C. 1983. Veterinary aspects of staphylococci. En: *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Vol. 1. (Eds.: Easmon, C.S.F. y Adlam, C.). Academic Press, Londres- Nueva York. 193-241.
- Andrews, S.C.;Robinson, A.K. y Rodriguez-Quinones, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews* 27: 215-237.
- Angelini, D.j.;Hasday, J.D.;Golblum, S.E. y Bannerman, D.D. 2005. Tumor necrosis factor- α -mediated pulmonary endothelial barrier dysfunction. *Curr. Respir. Med. Rev* 1: 233-246.
- Arrecubieta, C.;Matsunaga, I.;Asai, T.;Naka, Y.;Deng, M.C. y Lowy, F.D. 2008. Vaccination with clumping factor A and fibronectin binding protein A to prevent *Staphylococcus aureus* infection of an aortic patch in mice. *The Journal of infectious diseases* 198: 571-575.
- Bannerman, D.D.;Paape, M.J.;Lee, J.W.;Zhao, X.;Hope, J.C. y Rainard, P. 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 11: 463-472.
- Bannerman, T.L. 2003. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically*. ASM Press, , Washington, DC.
- Barkema, H.W.;Schukken, Y.H. y Zadoks, R.N. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science* 89: 1877-1895.
- Barrio, M.B.;Rainard, P.;Gilbert, F.B. y Poutrel, B. 2003. Assessment of the opsonic activity of purified bovine sIgA following intramammary immunization of cows with *Staphylococcus aureus*. *Journal of dairy science* 86: 2884-2894.

-
- Bavari, S.;Ulrich, R.G. y LeClaire, R.D. 1999. Cross-reactive antibodies prevent the lethal effects of *Staphylococcus aureus* superantigens. The Journal of infectious diseases 180: 1365-1369.
- Bergquist, C.;Lagergard, T.;Lindblad, M. y Holmgren, J. 1995. Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. Infect. Immun 63: 2021-2025.
- Berube, B.J. y Bubeck Wardenburg, J. 2013. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: nearly a century of intrigue. Toxins 5: 1140-1166.
- Beuvery, E.C.;van Rossum, F. y Nagel, J. 1982. Comparison of the induction of immunoglobulin M and G antibodies in mice with purified pneumococcal type 3 and meningococcal group C polysaccharides and their protein conjugates. Infection and immunity 37: 15-22.
- Bhakdi, S. y Tranum-Jensen, J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiological reviews 55: 733-751.
- Bondada, S.;Wu, H.;Robertson, D.A. y Chelvarajan, R.L.V.-., 557-565 (2000). 2000. Accessory cell defect in unresponsiveness of neonates and aged to polysaccharide vaccines. Vaccine 19: 557-565.
- Borrow, R.;Abad, R.;Trotter, C.;van der Klis, F.R. y Vazquez, J.A. 2013. Effectiveness of meningococcal serogroup C vaccine programmes. Vaccine 31: 4477-4486.
- Bramley, A.J.;Patel, A.H.;O'Reilly, M.;Foster, R. y Foster, T.J. 1989. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. Infect Immun 57: 2489-2494.
- Brandt, J.;Andersson, L.O. y Porath, J. 1975. Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. Biochimica et biophysica acta 386: 196-202.
- Brouillette, E.;Talbot, B.G. y Malouin, F. 2003a. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. Infection and immunity 71: 2292-2295.
- Brouillette, E.;Grondin, G.;Shkreta, L.;Lacasse, P. y Talbot, B.G. 2003b. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. Microbial pathogenesis 35: 159-168.
- Brouillette, E.;Lacasse, P.;Shkreta, L.;Belanger, J.;Grondin, G.;Diarra, M.S.y col. 2002. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. Vaccine 20: 2348-2357.
- Brown, W.C.;Rice-Ficht, A.C. y Estes, D.M. 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. Veterinary immunology and immunopathology 63: 45-55.
- Bryce, L.M. y Rountree, P.M. 1936. The production of beta-toxin by staphylococci. J Pathol Bacteriol 43: 173-189.
- Bubeck Wardenburg, J. y Schneewind, O. 2008. Vaccine protection against *Staphylococcus aureus* pneumonia. The Journal of experimental medicine 205: 287-294.
- Burke, F.M.;McCormack, N.;Rindi, S.;Speziale, P. y Foster, T.J. 2010. Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. BMC microbiology 10: 160.
- Burton, J.L. y Erskine, R.J. 2003. Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 19: 1-45, v.
- Bustos-Martínez, J.A.;Hamdan-Partida, A. y Gutiérrez-Cárdenas, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomédica 4: 287-305.
- Caffin, J.P. y Poutrel, B. 1988. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentration in milk. Journal of dairy science 71: 2035-2043.

-
- Calvinho, L.F. y Dodd, K. 1994. Virulence for mice of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis related to colonial morphology and serological types in serum-soft agar. Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B 41: 328-335.
- Calvinho, L.F. y Tirante, L. 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. Rev. FAVE, Sec. Cs. Vet 4: 29-40.
- Calvinho, L.F.;Donnelly, W.J. y Dodd, K. 1993. Effect of partially purified *Staphylococcus aureus* beta-haemolysin on the mammary gland of the mouse. Zentralbl Veterinarmed B 40: 559-568.
- Camussone, C.;Rejf, P.;Pujato, N.;Schwab, A.;Marcipar, I. y Calvinho, L.F. 2012. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Argentina. Braz. J. Microbiol 43: 1010-1014.
- Camussone, C.M. y Calvinho, L.F. 2013. [Virulence factors of *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infections in cows: relevance and role as immunogens]. Rev Argent Microbiol 45: 119-130.
- Camussone, C.M.;Veaute, C.M.;Porporatto, C.;Morein, B.;Marcipar, I.S. y Calvinho, L.F. 2013a. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX adjuvant. The Journal of dairy research 80: 72-80.
- Camussone, C.M.;Veaute, C.M.;Porporatto, C.;Morein, B.;Marcipar, I.S. y Calvinho, L.F. 2013b. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX adjuvant. The Journal of dairy research: 1-9.
- Camussone, C.M.;Veaute, C.M.;Pujato, N.;Morein, B.;Marcipar, I.S. y Calvinho, L.F. 2014a. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant. Research in veterinary science 96: 86-94.
- Camussone, C.M.;Pujato, N.;Renna, M.S.;Veaute, C.M.;Morein, B.;Marcipar, I.S.y col. 2014b. Immune response and functional role of antibodies raised inheifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 lysate and recombinant antigens vaccine formulated with Iscom matrix adjuvant. Veterinary immunology and immunopathology 162: 96-107.
- Capuco, A.V.;Paape, M.J. y Nickerson, S.C. 1986. In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. American journal of veterinary research 47: 663-668.
- Carter, E.W. y Kerr, D.E. 2003. Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and protein A as a prelude to immunization against staphylococcal mastitis. Journal of dairy science 86: 1177-1186.
- Casolini, F.;Visai, L.;Joh, D.;Conaldi, P.G.;Toniolo, A.;Hook, M.y col. 1998. Antibody response to fibronectin-binding adhesin FnbpA in patients with *Staphylococcus aureus* infections. Infect Immun 66: 5433-5442.
- Castagliuolo, I.;Piccinini, R.;Beggiao, E.;Palu, G.;Mengoli, C.;Ditadi, F.y col. 2006. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. Vaccine 24: 4393-4402.
- Castro, F.O.;Rojas, P.P. y Rodriguez, L. 2006. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. Rev. Agro-Ciencia 22(1): 49-58.
- Ciborowski, P.;Flock, J.I. y Wadstrom, T. 1992. Immunological response to a *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein. Journal of medical microbiology 37: 376-381.
- Cifrian, E.;Guidry, A.J.;O'Brien, C.N. y Marquardt, W.W. 1995. Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured teat, ductal and secretory mammary epithelial cells. Research in veterinary science 58: 20-25.

-
- Cifrian, E.; Guidry, A.J.; Bramley, A.J.; Norcross, N.L.; Bastida-Corcuera, F.D. y Marquardt, W.W. 1996. Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. *Veterinary microbiology* 48: 187-198.
- Clarke, S.R.; Brummell, K.J.; Horsburgh, M.J.; McDowell, P.W.; Mohamad, S.A.; Stapleton, M.R. y col. 2006. Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *The Journal of infectious diseases* 193: 1098-1108.
- Colditz, I.G. y Watson, D.L. 1985. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. *Australian veterinary journal* 62: 145-153.
- Corrigan, R.M.; Miajlovic, H. y Foster, T.J. 2009. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC microbiology* 9: 22.
- Costa, S.J.; Silva, P.; Almeida, A.; Conceicao, A.; Domingues, L. y Castro, A. 2013. A novel adjuvant-free H fusion system for the production of recombinant immunogens in *Escherichia coli*: Its application to a 12 kDa antigen from *Cryptosporidium parvum*. *Bioengineered* 4: 413-419.
- Cunnion, K.M.; Lee, J.C. y Frank, M.M. 2001. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 69: 6796-6803.
- Cunnion, K.M.; Zhang, H.M. y Frank, M.M. 2003. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. *Infection and immunity* 71: 656-662.
- Chang, B.S.; Moon, J.S.; Kang, H.M.; Kim, Y.I.; Lee, H.K.; Kim, J.D. y col. 2008. Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine* 26: 2081-2091.
- Chen, L.; Li, S.; Wang, Z.; Chang, R.; Su, J. y Han, B. 2012. Protective effect of recombinant staphylococcal enterotoxin A entrapped in polylactic-co-glycolic acid microspheres against *Staphylococcus aureus* infection. *Veterinary research* 43: 20.
- Chevallet, M.; Luche, S. y Rabilloud, T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc* 1: 1852-1858.
- Daley, M.; Williams, T.; Coyle, P.; Furda, G.; Dougherty, R. y Hayes, P. 1993. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5: 276-284.
- Dallard, B.E.; Baravalle, C.; Ortega, H.H.; Tumini, M.; Canavesio, V.R.; Neder, V.E. y col. 2009. Effect of a biological response modifier on expression of CD14 receptor and tumor necrosis factor-alpha in *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands at drying off. *Veterinary immunology and immunopathology* 132: 237-242.
- Delany, I.; Rappuoli, R. y Seib, K.L. 2013. Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3: a012476.
- Denis, M.; Wedlock, D.N.; Lacy-Hulbert, S.J.; Hillerton, J.E. y Buddle, B.M. 2009. Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: what is the best way forward? *New Zealand veterinary journal* 57: 132-140.
- Dettleux, J.C.; Kehrl, M.E., Jr.; Stabel, J.R.; Freeman, A.E. y Kelley, D.H. 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary immunology and immunopathology* 44: 251-267.
- DHHS. 1993. United States Department of Health and Human Services. Hazardous Substances Data Bank (HSDB, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD.

-
- Dinges, M.M.;Orwin, P.M. y Schlievert, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical microbiology reviews 13: 16-34, table of contents.
 - Dodd, F.H. y Jackson, E.R. 1971. Control of Bovine Mastitis. UK: British Cattle Veterinary Association.
 - Dryla, A.;Gelbmann, D.;von Gabain, A. y Nagy, E. 2003. Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. Molecular microbiology 49: 37-53.
 - Dziewanowska, K.;Patti, J.M.;Deobald, C.F.;Bayles, K.W.;Trumble, W.R. y Bohach, G.A. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infection and immunity 67: 4673-4678.
 - EPA. 1999. United States. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on Quinone National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC.
 - Estes, D.M. 1996. Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression. Veterinary immunology and immunopathology 54: 61-67.
 - F.A.S.S. 1999. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Federation of Animal Sciences Societies, Champaign, Illinois, EE.UU.
 - Fattom, A.;Schneerson, R.;Szu, S.C.;Vann, W.F.;Shiloach, J.;Karakawa, W.W.y col. 1990. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Infect. Immun 58: 2367-2374.
 - Fattom, A.;Li, X.;Cho, Y.H.;Burns, A.;Hawwari, A.;Shepherd, S.E.y col. 1995a. Effect of conjugation methodology, carrier protein, and adjuvants on the immune response to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Vaccine 13: 1288-1293.
 - Fattom, A.;Li, X.;Cho, Y.H.;Burns, A.;Hawwari, A.;Shepherd, S.E.y col. 1995b. Effect of conjugation methodology, carrier protein, and adjuvants on the immune response to *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Vaccine 13: 1288-1293.
 - Fattom, A.;Schneerson, R.;Watson, D.C.;Karakawa, W.W.;Fitzgerald, D.;Pastan, I.y col. 1993. Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to *Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A. Infection and immunity 61: 1023-1032.
 - Fattom, A.I.;Sarwar, J.;Basham, L.;Ennifar, S. y Naso, R. 1998. Antigenic determinants of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide vaccines. Infection and immunity 66: 4588-4592.
 - Fattom, A.I.;Horwith, G.;Fuller, S.;Propst, M. y Naso, R. 2004. Development of StaphVAX, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials. Vaccine 22: 880-887.
 - FDA. 2006. Proposed Rule, Docket N° 1978N-0065. United States Food and Drug Administration. Department Of Health And Human Services, U.S.
 - Fitzpatrick, J.L.;Cripps, P.J.;Hill, A.W.;Bland, P.W. y Stokes, C.R. 1992. MHC class II expression in the bovine mammary gland. Veterinary immunology and immunopathology 32: 13-23.
 - Foster, T.J. y Hook, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends in microbiology 6: 484-488.
 - Fournier, B. y Philpott, D.J. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. Clinical microbiology reviews 18: 521-540.

- Fournier, C.;Kuhnert, P.;Frey, J.;Miserez, R.;Kirchhofer, M.;Kaufmann, T.y col. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. Research in veterinary science 85: 439-448.
- Fowler, T.;Wann, E.R.;Joh, D.;Johansson, S.;Foster, T.J. y Hook, M. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. European journal of cell biology 79: 672-679.
- Fraunholz, M. y Sinha, B. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. Frontiers in cellular and infection microbiology 2: 43.
- Freer, J.H. y Birkbeck, T.H. 1982. Possible conformation of delta-lysin, a membrane-damaging peptide of *Staphylococcus aureus*. Journal of theoretical biology 94: 535-540.
- García, A. 2004. Mastitis contagiosa vs ambiental. Cooperative Extension Service (SDSU). Dairy Science, Extension Extra 4028S. College of Agriculture & Biological Sciences. South Dakota State University. USA. <http://dairysci.sdstate.edu/departmentsinfo/publications/publications.cfm> (consulta: 17 de febrero, 2014)
- Garcia de Vinuesa, C.;O'Leary, P.;Sze, D.M.;Toellner, K.M. y MacLennan, I.C. 1999. T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. European journal of immunology 29: 1314-1323.
- Gilbert, F.B.;Poutrel, B. y Sutra, L. 1994. Immunogenicity in cows of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide-ovalbumin conjugate. Vaccine 12: 369-374.
- Giraud, J.A.;Calzolari, A.;Rampone, H.;Rampone, A.;Giraud, A.T.;Bogni, C.y col. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. J Dairy Sci 80: 845-853.
- Gong, R.;Hu, C.;Xu, H.;Guo, A.;Chen, H.;Zhang, G.y col. 2010. Evaluation of clumping factor A binding region A in a subunit vaccine against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. Clinical and vaccine immunology : CVI 17: 1746-1752.
- Gonzalez, R.N.;Cullor, J.S.;Jasper, D.E.;Farver, T.B.;Bushnell, R.B. y Oliver, M.N. 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant Escherichia coli vaccine. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire 53: 301-305.
- Goudswaard, J.;van der Donk, J.A.;Noordzij, A.;van Dam, R.H. y Vaerman, J.P. 1978. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. Scandinavian journal of immunology 8: 21-28.
- Gouwy, M.;Struyf, S.;Proost, P. y Van Damme, J. 2005. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. Cytokine & growth factor reviews 16: 561-580.
- Guidry, A.;Fattom, A.;Patel, A.;O'Brien, C.;Shepherd, S. y Lohuis, J. 1998. Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. Am J Vet Res 59: 1537-1539.
- Guidry, A.J.;Berning, L.M. y Hambleton, C.N. 1993. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by bovine immunoglobulin isotypes. Journal of dairy science 76: 1285-1289.
- Guidry, A.J.;Oliver, S.P.;Squiggins, K.E.;Erbe, E.F.;Dowlen, H.H.;Hambleton, C.N.y col. 1991. Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. Journal of dairy science 74: 3360-3369.
- Guner, E.S. 1996. Complement evasion by the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* grown in host-derived tissue co-cultures: role of fibronectin in complement-resistance. Experientia 52: 364-372.
- Haley, K.P. y Skaar, E.P. 2012. A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. Microbes and infection / Institut Pasteur 14: 217-227.
- Haley, K.P.;Janson, E.M.;Heilbronner, S.;Foster, T.J. y Skaar, E.P. 2011. *Staphylococcus lugdunensis* IsdG liberates iron from host heme. Journal of bacteriology 193: 4749-4757.

- Hall, A.E.;Domanski, P.J.;Patel, P.R.;Vernachio, J.H.;Stribeys, P.J.;Gorovits, E.L.y col. 2003. Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A. *Infection and immunity* 71: 6864-6870.
- Han, H.R.;Pak, S., 2nd y Guidry, A. 2000. Prevalence of capsular polysaccharide (CP) types of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and protection of *S. aureus* infection in mice with CP vaccine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 62: 1331-1333.
- Harmon, R.J. y Heald, C.W. 1982. Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *American journal of veterinary research* 43: 992-998.
- Hartford, O.;Francois, P.;Vaudaux, P. y Foster, T.J. 1997. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Molecular microbiology* 25: 1065-1076.
- Hartford, O.M.;Wann, E.R.;Hook, M. y Foster, T.J. 2001. Identification of residues in the *Staphylococcus aureus* fibrinogen-binding MSCRAMM clumping factor A (ClfA) that are important for ligand binding. *The Journal of biological chemistry* 276: 2466-2473.
- Hawkins, J.;Kodali, S.;Matsuka, Y.V.;McNeil, L.K.;Mininni, T.;Scully, I.L.y col. 2012. A recombinant clumping factor A-containing vaccine induces functional antibodies to *Staphylococcus aureus* that are not observed after natural exposure. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 19: 1641-1650.
- Hensen, S.M.;Pavicic, M.J.;Lohuis, J.A. y Poutrel, B. 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of dairy science* 83: 418-429.
- Herbelin, C. y Poutrel, B. 1995. Purification of *Staphylococcus aureus* beta-haemolysin by a simple efficient method. *Journal of Microbiological Methods* 21: 163-171.
- Herbelin, C.;Poutrel, B.;Gilbert, F.B. y Rainard, P. 1997. Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with staphylococcal alpha-toxin. *Journal of dairy science* 80: 2025-2034.
- Herbert, S.;Worlitzsch, D.;Dassy, B.;Boutonnier, A.;Fournier, J.M.;Bellon, G.y col. 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO2 inhibition in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 176: 431-438.
- Heringstad, B.;Klemetsdal, G. y Steine, T. 2003. Selection responses for clinical mastitis and protein yield in two Norwegian dairy cattle selection experiments. *Journal of dairy science* 86: 2990-2999.
- Higgins, J.;Loughman, A.;van Kessel, K.P.;van Strijp, J.A. y Foster, T.J. 2006. Clumping factor A of *Staphylococcus aureus* inhibits phagocytosis by human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS microbiology letters* 258: 290-296.
- Hillerton, J.E. y Berry, E.A. 2005. Treating mastitis in the cow--a tradition or an archaism. *Journal of applied microbiology* 98: 1250-1255.
- Hogan, J. y Larry Smith, K. 2003. Coliform mastitis. *Veterinary research* 34: 507-519.
- Hu, S.;Concha, C.;Lin, F. y Persson Waller, K. 2003. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* 91: 29-37.
- Huesca, M.;Sun, Q.;Peralta, R.;Shivji, G.M.;Sauder, D.N. y McGavin, M.J. 2000. Synthetic peptide immunogens elicit polyclonal and monoclonal antibodies specific for linear epitopes in the D motifs of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein, which are composed of amino acids that are essential for fibronectin binding. *Infection and immunity* 68: 1156-1163.

- Huseby, M.;Shi, K.;Brown, C.K.;Digre, J.;Mengistu, F.;Seo, K.S.y col. 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 189: 8719-8726.
- Huyet, J.;Naylor, C.E.;Savva, C.G.;Gibert, M.;Popoff, M.R. y Basak, A.K. 2013. Structural Insights into Delta Toxin Pore Formation. *PloS one* 8: e66673.
- Huynh, H.T.;Robitaille, G. y Turner, J.D. 1991. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. *Experimental cell research* 197: 191-199.
- Hwang, C.Y.;Pak, S.I. y Han, H.R. 2000. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 62: 875-880.
- IARC. 1977. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, vol 15. World Health Organization, Lyon.
- Ismail, A. 2012. Purification of fibrinogen from human plasma. In *Chemical & Biomolecular Engineering Theses, Dissertations, & Student Research. Paper 13.* <http://digitalcommons.unl.edu/chemengtheses/13>. University of Nebraska, Lincoln.
- Joh, D.;Wann, E.R.;Kreikemeyer, B.;Speziale, P. y Hook, M. 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 18: 211-223.
- Jones, C. 2005. Revised structures for the capsular polysaccharides from *Staphylococcus aureus* Types 5 and 8, components of novel glycoconjugate vaccines. *Carbohydr Res* 340: 1097-1106.
- Josefsson, E.;Higgins, J.;Foster, T.J. y Tarkowski, A. 2008. Fibrinogen binding sites P336 and Y338 of clumping factor A are crucial for *Staphylococcus aureus* virulence. *PloS one* 3: e2206.
- Josefsson, E.;Hartford, O.;O'Brien, L.;Patti, J.M. y Foster, T. 2001. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *The Journal of infectious diseases* 184: 1572-1580.
- Kalorey, D.R.;Shanmugam, Y.;Kurkure, N.V.;Chousalkar, K.K. y Barbuddhe, S.B. 2007. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. *Journal of veterinary science* 8: 151-154.
- Karakawa, W.W. y Vann, W.F. 1982. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semin. Infect. Dis* 4: 285-293.
- Karakawa, W.W.;Sutton, A.;Schneerson, R.;Karpas, A. y Vann, W.F. 1988. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and immunity* 56: 1090-1095.
- Karakawa, W.W.;Fournier, J.M.;Vann, W.F.;Arbeit, R.;Schneerson, R.S. y Robbins, J.B. 1985a. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology* 22: 445-447.
- Karakawa, W.W.;Fournier, J.M.;Vann, W.F.;Arbeit, R.;Schneerson, R.S. y Robbins, J.B. 1985b. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol* 22: 445-447.
- Kauf, A.C.;Vinyard, B.T. y Bannerman, D.D. 2007. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Research in veterinary science* 82: 39-46.
- Kenny, K.;Bastida, F.D. y Norcross, N.L. 1992. Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 56: 265-268.

- Kim, H.K.;Kim, H.Y.;Schneewind, O. y Missiakas, D. 2011. Identifying protective antigens of *Staphylococcus aureus*, a pathogen that suppresses host immune responses. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 25: 3605-3612.
- Klein Klouwenberg, P. y Bont, L. 2008. Neonatal and infantile immune responses to encapsulated bacteria and conjugate vaccines. Clin. Dev. Immunol 2008: 628963.
- Klein, R.C.;Fabres-Klein, M.H.;Brito, M.A.;Fietto, L.G. y Ribon Ade, O. 2012. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. Veterinary microbiology 160: 183-188.
- Kociņa, I.;Antāne, V. y Lūsis, I. 2012. The Concentration of Immunoglobulins A, G, and M in Cow Milk and Blood in Relation with Cow Seasonal Keeping and Pathogens Presence in the Udder. Latvia University of Agriculture 27: 44-53.
- Korhonen, H. y Kaartinen, L. 1995. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In M. Sandholm, T. Honkanen, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, & S. Pyorala (Eds.), The Bovine Udder and Mastitis (pp. 76-82).Iyvaskyla, Finland: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Korhonen, H.;Marnila, P. y Gill, H.S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. The British journal of nutrition 84 Suppl 1: S75-80.
- Kozel, T.R. y Hermerath, C.A. 1984. Binding of cryptococcal polysaccharide to *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 43: 879-886.
- Krishna Kumar, K.;Jacques, D.A.;Pishchany, G.;Caradoc-Davies, T.;Spirig, T.;Malmirchegini, G.R.y col. 2011. Structural basis for hemoglobin capture by *Staphylococcus aureus* cell-surface protein, IsdH. The Journal of biological chemistry 286: 38439-38447.
- Kuklin, N.A.;Clark, D.J.;Secore, S.;Cook, J.;Cope, L.D.;McNeely, T.y col. 2006. A novel *Staphylococcus aureus* vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. Infection and immunity 74: 2215-2223.
- Kuo, J.S.C. y Ree, H.K. 1996. Pneumococcal polysaccharide-recombinant pneumolysin conjugate vaccines for immunization against pneumococcal infections. US 5565204 A. American Cyanamid Company, USA., USA.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Laferriere, C.A.;Sood, R.K.;de Muys, J.M.;Michon, F. y Jennings, H.J. 1998. Streptococcus pneumoniae type 14 polysaccharide-conjugate vaccines: length stabilization of opsonophagocytic conformational polysaccharide epitopes. Infection and immunity 66: 2441-2446.
- Larsen, H.D.;Aarestrup, F.M. y Jensen, N.E. 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. Vet Microbiol 85: 61-67.
- Le Marechal, C.;Seyffert, N.;Jardin, J.;Hernandez, D.;Jan, G.;Rault, L.y col. 2011. Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. PloS one 6: e27354.
- Lee, J.W.;O'Brien, C.N.;Guidry, A.J.;Paape, M.J.;Shafer-Weaver, K.A. y Zhao, X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. Can. J. Vet. Res 69: 11-18.
- Leitner, G.;Yadlin, N.;Lubashevsky, E.;Ezra, E.;Glickman, A.;Chaffer, M.y col. 2003. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. Veterinary immunology and immunopathology 93: 153-158.

-
- Lisa, R.W. y Plano, M.D. 2004. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. JID 122: 1070-1077.
- Low, D.K.R. y Freer, J.H. 1977. The purification of β -lysin (sphingomyelinase C) from *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett 2: 139-143.
- Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339: 520-532.
- Maira-Litran, T.;Kropec, A.;Goldmann, D.A. y Pier, G.B. 2005. Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated Staphylococcal Poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine. Infect. Immun 73: 6752-6762.
- Mallard, B.A.;Burnside, E.B.;Burton, J.H. y Wilkie, B.N. 1983. Variation in serum immunoglobulins in Canadian Holstein-Friesians. Journal of dairy science 66: 862-866.
- Mallard, B.A.;Dekkers, J.C.;Ireland, M.J.;Leslie, K.E.;Sharif, S.;Vankampen, C.L.y col. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. Journal of dairy science 81: 585-595.
- Mamo, W.;Jonsson, P. y Muller, H.P. 1995. Opsonization of *Staphylococcus aureus* with a fibronectin-binding protein antiserum induces protection in mice. Microbial pathogenesis 19: 49-55.
- Marrack, P. y Kappler, J. 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science 248: 705-711.
- Marshall, M.J.;Bohach, G.A. y Boehm, D.F. 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. Journal of natural toxins 9: 125-138.
- Martinez-Pulgarin, S.;Dominguez-Bernal, G.;Orden, J.A. y de la Fuente, R. 2009. Simultaneous lack of catalase and beta-toxin in *Staphylococcus aureus* leads to increased intracellular survival in macrophages and epithelial cells and to attenuated virulence in murine and ovine models. Microbiology 155: 1505-1515.
- Mata, F. 2013. Mastitis vaccination in dairy cattle: a meta-analysis of field case-control trials. Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias 108: 17-22.
- Middleton, J.R. 2008. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccine development. Expert Rev Vaccines 7: 805-815.
- Middleton, J.R. 2013. *Staphylococcus aureus* mastitis: Have we learned anything in the last 50 years? National Mastitis Council. Regional Meeting proceedings. University of Missouri. Columbia, Missouri, USA.
- Middleton, J.R.;Ma, J.;Rinehart, C.L.;Taylor, V.N.;Luby, C.D. y Steevens, B.J. 2006. Efficacy of different Lysin formulations in the prevention of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy heifers. The Journal of dairy research 73: 10-19.
- Miles, A.A.;Misra, S.S. y Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. The Journal of hygiene 38: 732-749.
- Mohan, T.;Verma, P. y Rao, D.N. 2013. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. The Indian journal of medical research 138: 779-795.
- Mond, J.J.;Vos, Q.;Lees, A. y Snapper, C.M. 1995. T cell independent antigens. Curr. Opin. Immunol 7: 349-354.
- Moore, K.W.;de Waal Malefyt, R.;Coffman, R.L. y O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual review of immunology 19: 683-765.

-
- Morein, B. 2007.b. New ISCOMS meet unsettled vaccine demands in vaccine adjuvants and delivery systems. En: Manmohan Sing (Ed), Vaccine adjuvants and delivery systems. John Wiley & Sons, Inc.: 191-222.
- Morein, B.;Lövgren-Bengtsson, K.;Ranlund, K.;Fromgren, B.;Ekstrom, J. y Baschunan, C.C. 2011. Vaccine composition comprising a fibronectin binding protein or a fibronectin binding peptide. Google Patents.
- Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol* 7: 145-173.
- Myllys, V. y Rautala, H. 1995. Characterization of clinical mastitis in primiparous heifers. *Journal of dairy science* 78: 538-545.
- Nabel, G.J. 2013. Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med* 368: 551-560.
- Nansen, P. 1972. Selective immunoglobulin deficiency in cattle and susceptibility to infection. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]. Microbiol Immunol.* 80: 49-54.
- Ni Eidhin, D.;Perkins, S.;Francois, P.;Vaudaux, P.;Hook, M. y Foster, T.J. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 30: 245-257.
- Nickerson, S.C. 1987. Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191: 1484-1488.
- Nickerson, S.C.;Owens, W.E. y Boddie, R.L. 1993. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection, and mammary histology in nonlactating dairy cows. *Journal of dairy science* 76: 1290-1297.
- Nickerson, S.C.;Owens, W.E.;Tomita, G.M. y Widel, P.W. 1999. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim. Practice* 3, 16±28. *Large Anim. Practice* 3: 16-28.
- Nimmerjahn, F. y Ravetch, J.V. 2005. Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310: 1510-1512.
- Nordhaug, M.L.;Nesse, L.L.;Norcross, N.L. y Gudding, R. 1994a. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 2. Antibody response. *Journal of dairy science* 77: 1276-1284.
- Nordhaug, M.L.;Nesse, L.L.;Norcross, N.L. y Gudding, R. 1994b. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *Journal of dairy science* 77: 1267-1275.
- Nour El-Din, A.N.;Shkreta, L.;Talbot, B.G.;Diarra, M.S. y Lacasse, P. 2006. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 24: 1997-2006.
- Novick, R.P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular microbiology* 48: 1429-1449.
- O'Brien, C.N.;Guidry, A.J.;Fattom, A.;Shepherd, S.;Douglass, L.W. y Westhoff, D.C. 2000. Production of antibodies to *Staphylococcus aureus* serotypes 5, 8, and 336 using poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of dairy science* 83: 1758-1766.
- O'Connell, D.P.;Nanavaty, T.;McDevitt, D.;Gurusiddappa, S.;Hook, M. y Foster, T.J. 1998. The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* has a Ca²⁺-dependent inhibitory site. *The Journal of biological chemistry* 273: 6821-6829.
- O'Neill, L.A.;Dinesrstein, N. y Aucken, H. 2000. Carriage of MSCRAMM and fibrinogen-binding protein genes by epidemic and non-epidemic isolates of MRSA [abstract 147]. Program and abstracts: 9th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections 41.

- O’Riordan, K. y Lee, J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews* 17: 218-234.
- Okada, H.;Ohtsuka, H.;Kon Nai, S.;Kirisawa, R.;Yokomizo, Y.;Yoshino, T.y col. 1999. Effects of lipopolysaccharide on production of interleukin-1 and interleukin-6 by bovine mammary epithelial cells in vitro. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 61: 33-35.
- Oliver, S.;Almeida, R.;Lewis, M.;Gillespie, B. y Dowlen, H. 1999. Prevalencia de mastitis en vaquillonas y estrategias para su control. In *Memorias Jornadas ALMAST’99 Calidad de Leche y Mastitis*, Villa María, Córdoba 14-28.
- Oliver, S.P.;Gonzalez, R.N.;Hogan, J.S.;Jayarao, B.M. y Owens, W.E. 2004. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*. National Mastitis Council, 4th edition, Verona, Wisconsin, EE.UU.
- Ote, I.;Taminiau, B.;Duprez, J.N.;Dizier, I. y Mainil, J.G. 2011. Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Veterinary microbiology* 153: 285-292.
- Paape, M.;Mehrzahl, J.;Zhao, X.;Dettleux, J. y Burvenich, C. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7: 109-121.
- Paape, M.J.;Shafer-Weaver, K.;Capuco, A.V.;Van Oostveldt, K. y Burvenich, C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Advances in experimental medicine and biology* 480: 259-277.
- Park, Y.H.;Fox, L.K.;Hamilton, M.J. y Davis, W.C. 1993. Suppression of proliferative response of BoCD4+ T lymphocytes by activated BoCD8+ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 36: 137-151.
- Pearse, M.J. y Drane, D. 2004. ISCOMATRIX adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 22: 2391-2395.
- Pellegrino, M.;Giraud, J.;Raspanti, C.;Odierno, L. y Bogni, C. 2010. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* 28: 4523-4528.
- Pereira, U.P.;Oliveira, D.G.;Mesquita, L.R.;Costa, G.M. y Pereira, L.J. 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: a systematic review. *Veterinary microbiology* 148: 117-124.
- Philpot, N. y Nickerson, S.C. 1992. *Mastitis: el contra ataque*. Ed. Surge Internacional. Naperville, IL, U.S.A; 1992.
- Philpot, W.N. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de la leche y la reducción de la mastitis. En: *Curso de perfeccionamiento y mejoramiento de la calidad higiénica de leche de pequeños productores*. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias; UFOCO S.A. 49-84.
- Pilpa, R.M.;Fadeev, E.A.;Villareal, V.A.;Wong, M.L.;Phillips, M. y Clubb, R.T. 2006. Solution structure of the NEAT (NEAr Transporter) domain from IsdH/HarA: the human hemoglobin receptor in *Staphylococcus aureus*. *Journal of molecular biology* 360: 435-447.
- Pishchany, G. y Skaar, E.P. 2012. Taste for blood: hemoglobin as a nutrient source for pathogens. *PLoS pathogens* 8: e1002535.
- Piubelli, L.;Campa, M.;Temporini, C.;Binda, E.;Mangione, F.;Amicosante, M.y col. 2013. Optimizing *Escherichia coli* as a protein expression platform to produce *Mycobacterium tuberculosis* immunogenic proteins. *Microbial cell factories* 12: 115.

- Potter, T. 2011. Colostrum: Getting the right start. *Livestock* 16.
- Poutrel, B. y Sutra, L. 1993. Type 5 and 8 capsular polysaccharides are expressed by *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits, poultry, pigs, and horses. *Journal of clinical microbiology* 31: 467-469.
- Pozzi, C.;Wilk, K.;Lee, J.C.;Gening, M.;Nifantiev, N. y Pier, G.B. 2012. Opsonic and protective properties of antibodies raised to conjugate vaccines targeting six *Staphylococcus aureus* antigens. *PloS one* 7: e46648.
- Pujato, N.P. 2009. Desarrollo de un inmunógeno basado en exopolisacáridos capsulares destinado al control de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*. In Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL, Santa Fe, Argentina.
- Que, Y.A.;Francois, P.;Haefliger, J.A.;Entenza, J.M.;Vaudaux, P. y Moreillon, P. 2001. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infection and immunity* 69: 6296-6302.
- Raffaelli, J.M. 2009a. Desarrollo de un antígeno potencialmente inmunogénico para la prevención de la mastitis bovina. In Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL, Santa Fe, Argentina.
- Raffaelli, J.M. 2009b. Desarrollo de un antígeno potencialmente inmunogénico para la prevención de la mastitis bovina. In Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL, Santa Fe, Argentina.
- Rainard, P. y Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary research* 37: 369-400.
- Reed, S.G.;Bertholet, S.;Coler, R.N. y Friede, M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology* 30: 23-32.
- Rennermalm, A.;Li, Y.H.;Bohaufts, L.;Jarstrand, C.;Brauner, A.;Brennan, F.R.y col. 2001. Antibodies against a truncated *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein protect against dissemination of infection in the rat. *Vaccine* 19: 3376-3383.
- Revelli, G.R. y Rodríguez, C.G. 2001. Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. *Tecnología Láctea Latinoamericana*. 6: 48-53.
- Ribeiro, C. Assessment of the use of the Startvac[®] vaccine on a dairy farm affected by environmental mastitis In Startvac[™] Library. 5th. E. Laboratorios HIPRA S.A., ed. 1-4.
- Rice, K.;Huesca, M.;Vaz, D. y McGavin, M.J. 2001. Variance in fibronectin binding and fnb locus polymorphisms in *Staphylococcus aureus*: identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant *S. aureus*. *Infect Immun* 69: 3791-3799.
- Riollet, C.;Rainard, P. y Poutrel, B. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 7: 161-167.
- Risley, A.L.;Loughman, A.;Cywes-Bentley, C.;Foster, T.J. y Lee, J.C. 2007. Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. *The Journal of infectious diseases* 196: 919-927.
- Roberson, J. 1999. The Epidemiology of *Staphylococcus aureus* on Dairy Farms. National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. p. 38.
- Rubio, I.;Bolchi, A.;Moretto, N.;Canali, E.;Gissmann, L.;Tommasino, M.y col. 2009. Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20 -- 38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. *Vaccine* 27: 1949-1956.

- Rueckert, C. y Guzman, C.A. 2012. Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS pathogens* 8: e1003001.
- Said-Salim, B.;Mathema, B.;Braughton, K.;Davis, S.;Sinsimer, D.;Eisner, W.y col. 2005. Differential distribution and expression of Pantone-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of clinical microbiology* 43: 3373-3379.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor laboratory, New York, EE.UU.
- Sandholm, M. y Korhonen, H. 1995. Antibacterial defence mechanisms of the udder. In M. Sandholm, T. Honkanen, T. Honkanen-Buzalski, L. Kaartinen, & S. Pyorala (Eds.), *The Bovine Udder and Mastitis* (pp. 37-48). Iyaskyla, Finland: Gummerus Kirjapaino Oy.
- Sandholm, M.;Kaartinen, L. y Pyorala, S. 1990. Bovine mastitis--why does antibiotic therapy not always work? An overview. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 13: 248-260.
- Schaffer, A.C. y Lee, J.C. 2008. Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents* 32 Suppl 1: S71-78.
- Schaffer, A.C.;Solinga, R.M.;Cocchiario, J.;Portoles, M.;Kiser, K.B.;Risley, A.y col. 2006. Immunization with *Staphylococcus aureus* clumping factor B, a major determinant in nasal carriage, reduces nasal colonization in a murine model. *Infection and immunity* 74: 2145-2153.
- Schennings, T.;Heimdahl, A.;Coster, K. y Flock, J.I. 1993. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microbial pathogenesis* 15: 227-236.
- Schroder, K.;Hertzog, P.J.;Ravasi, T. y Hume, D.A. 2004. Interferon- gamma: An overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol* 75: 163-189.
- Schukken, Y.H.;Bronzo, V.;Locatelli, C.;Pollera, C.;Rota, N.;Casula, A.y col. 2014. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal of dairy science* 97: 5250-5264.
- Seol, J.W.;Kang, S.J. y Park, S.Y. 2010. Silver ion treatment of primary cultured bovine mammary gland epithelial cell (BMEC) damage from *Staphylococcus aureus*-derived alpha-toxin. *Veterinary research communications* 34: 33-42.
- Shafer-Weaver, K.A. y Sordillo, L.M. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *Journal of dairy science* 79: 1347-1352.
- Shafer-Weaver, K.A.;Pighetti, G.M. y Sordillo, L.M. 1996. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine 212: 271-280.
- Shafer-Weaver, K.A.;Corl, C.M. y Sordillo, L.M. 1999. Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *Journal of dairy science* 82: 1696-1706.
- Shalm, O.W.;Carroll, E.J. y Jain, N.C. 1971. *Bovine Mastitis*. Lea & Febiger, Philadelphia, EE.UU.
- Shannon, O.;Uekotter, A. y Flock, J.I. 2006. The neutralizing effects of hyperimmune antibodies against extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus*. *Scandinavian journal of immunology* 63: 184-190.
- Shen, X.;Lagergard, T.;Yang, Y.;Lindblad, M.;Fredriksson, M. y Holmgren, J. 2001. Group B Streptococcus capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccines prepared by different methods for intranasal immunization. *Infect. Immun* 69: 297-306.

- Shkreta, L.;Talbot, B.G.;Diarra, M.S. y Lacasse, P. 2004. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine* 23: 114-126.
- Shompole, S.;Henon, K.T.;Liou, L.E.;Dziewanowska, K.;Bohach, G.A. y Bayles, K.W. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Molecular microbiology* 49: 919-927.
- Siegel, I. y Cohen, S. 1964. Action of staphylococcal toxin on human platelets. *J. Infect. Dis.* 1964, 114, –488–502. *J. Infect. Dis.* 114: 488-502.
- Siemsen, D.W.;Schepetkin, I.A.;Kirpotina, L.N.;Lei, B. y Quinn, M.T. 2007. Neutrophil isolation from nonhuman species. *Methods in molecular biology* 412: 21-34.
- Sinha, B. y Fraunholz, M. 2010. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *International journal of medical microbiology : IJMM* 300: 170-175.
- Sitbon, E. y Pietrokovski, S. 2007. Occurrence of protein structure elements in conserved sequence regions. *BMC structural biology* 7: 3.
- Sittig, M. 1985. *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. In 2nd ed. Noyes Publications, Park Ridge, NJ. .
- Skaar, E.P. y Schneewind, O. 2004. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6: 390-397.
- Smeltzer, M.S. y Gillaspay, A.F. 2000. Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poultry science* 79: 1042-1049.
- Smith, K.L. y Schanbacher, F.L. 1977. Lactoferrin as a factor of resistance to infection of the bovine mammary gland. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170: 1224-1227.
- Smith, K.L. y Hoogan, J.S. 2001. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. www.veterinaria.uchile.cl/publication/congresoxi/pr/bovi/15.doc.
- Smith, K.L.;Hogan, J.S. y Todhunter, D.A. 1990. A method for estimating confidence in the microbiological diagnosis of intramammary infection. In: *Proceedings Natl Mastitis Council*. 29:76-79.
- Soltys, J. y Quinn, M.T. 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infection and immunity* 67: 6293-6302.
- Sompolinsky, D.;Samra, Z.;Karakawa, W.W.;Vann, W.F.;Schneerson, R. y Malik, Z. 1985. Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *Journal of clinical microbiology* 22: 828-834.
- Song, L.;Hobaugh, M.R.;Shustak, C.;Cheley, S.;Bayley, H. y Gouaux, J.E. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274: 1859-1866.
- Sordelli, D.O.;Buzzola, F.R.;Gomez, M.I.;Steele-Moore, L.;Berg, D.;Gentilini, E.y col. 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *Journal of clinical microbiology* 38: 846-850.
- Sordillo, L.M. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science* 98: 89-99.
- Sordillo, L.M. y Streicher, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 7: 135-146.
- Sordillo, L.M.;Campos, M. y Babiuk, L.A. 1991. Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2. *Journal of dairy science* 74: 3370-3375.

-
- Sordillo, L.M.;Shafer-Weaver, K. y DeRosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of dairy science* 80: 1851-1865.
- Sordillo, L.M.;Nickerson, S.C.;Akers, R.M. y Oliver, S.P. 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *The International journal of biochemistry* 19: 1165-1172.
- Stanley, K.K. y Luzio, J.P. 1984. Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins. *The EMBO journal* 3: 1429-1434.
- Ster, C.;Beaudoin, F.;Diarra, M.S.;Jacques, M.;Malouin, F. y Lacasse, P. 2010. Evaluation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated proteins as vaccine targets. *Veterinary immunology and immunopathology* 136: 311-318.
- Stills, H.F., Jr. 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46: 280-293.
- Stranger-Jones, Y.K.;Bae, T. y Schneewind, O. 2006. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 16942-16947.
- Sukumwang, N. y Umezawa, K. 2013. Earthworm-derived pore-forming toxin lysenin and screening of its inhibitors. *Toxins* 5: 1392-1401.
- Sun, H.X.;Xie, Y. y Ye, Y.P. 2009. ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine* 27: 4388-4401.
- Sun, Q.;Smith, G.M.;Zahradka, C. y McGavin, M.J. 1997. Identification of D motif epitopes in *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein for the production of antibody inhibitors of fibronectin binding. *Infect Immun* 65: 537-543.
- Sutra, L. y Poutrel, B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology* 40: 79-89.
- Sutra, L.;Rainard, P. y Poutrel, B. 1990. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *Journal of clinical microbiology* 28: 2253-2258.
- Targowski, S.P. y Klucinski, W. 1985. Effect of immune complexes from mastitic milk on blocking of Fc receptors and phagocytosis. *Infection and immunity* 47: 484-488.
- Targowski, S.P. y Niemialtowski, M. 1986. Inhibition of lacteal leukocyte phagocytosis by colostrum, nonlactating secretion, and mastitic milk. *American journal of veterinary research* 47: 1940-1945.
- Taylor, B.C.;Dellinger, J.D.;Cullor, J.S. y Stott, J.L. 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cellular immunology* 156: 245-253.
- Ternyck, T. y Avrameas, S. 1976. A new method using p-benzoquinone for coupling antigens and antibodies to marker substances. *Ann Immunol* 127: 197-208.
- Thakker, M.;Park, J.S.;Carey, V. y Lee, J.C. 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun* 66: 5183-5189.
- Tijssen, P. 1993a. Practice and theory of enzyme immunoassays. In *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. R. H. Burdon, and P. H. Knippenberg, eds. Elsevier Science, Amsterdam. 245-247.

- Tijssen, P. 1993b. Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates. In Practice and theory of enzyme immunoassays R. H. Burdon, and P. H. Knippenberg, eds. Elsevier Science Amsterdam. 245-247.
- Todar, K. 2008. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Disease. Todar's Online Textbook of Bacteriology. Madison, Wisconsin.
- Tollersrud, T.;Kenny, K.;Reitz, A.J., Jr. y Lee, J.C. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of clinical microbiology* 38: 2998-3003.
- Tollersrud, T.;Zernichow, L.;Andersen, S.R.;Kenny, K. y Lund, A. 2001. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine* 19: 3896-3903.
- Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* 3: 133-146.
- Trivier, D. y Courcol, R.J. 1996. Iron depletion and virulence in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 141: 117-127.
- Tuchscher, L.;Loffler, B.;Buzzola, F.R. y Sordelli, D.O. 2010. *Staphylococcus aureus* adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiol* 5: 1823-1832.
- Tuchscher, L.P.;Buzzola, F.R.;Alvarez, L.P.;Lee, J.C. y Sordelli, D.O. 2008. Antibodies to capsular polysaccharide and clumping factor A prevent mastitis and the emergence of unencapsulated and small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in mice. *Infection and immunity* 76: 5738-5744.
- Tuchscher, L.P.;Gomez, M.I.;Buzzola, F.R.;Calvinho, L.F.;Lee, J.C. y Sordelli, D.O. 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity* 75: 5483-5488.
- Valiente-Gabioud, A.A.;Veaute, C.;Perrig, M.;Galan-Romano, F.S.;Sferco, S.J. y Marcipar, I.S. 2011. Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of Trypanosoma cruzi FRA protein. *Experimental parasitology* 127: 672-679.
- Verdier, I.;Durand, G.;Bes, M.;Taylor, K.L.;Lina, G.;Vandenesch, F. y col. 2007. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *Journal of clinical microbiology* 45: 725-729.
- Verdon, J.;Girardin, N.;Lacombe, C.;Berjeaud, J.M. y Hechard, Y. 2009. delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 30: 817-823.
- Vernachio, J.;Bayer, A.S.;Le, T.;Chai, Y.L.;Prater, B.;Schneider, A. y col. 2003. Anti-clumping factor A immunoglobulin reduces the duration of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in an experimental model of infective endocarditis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47: 3400-3406.
- Visai, L.;Xu, Y.;Casolini, F.;Rindi, S.;Hook, M. y Speziale, P. 2000. Monoclonal antibodies to CNA, a collagen-binding microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, detach *Staphylococcus aureus* from a collagen substrate. *The Journal of biological chemistry* 275: 39837-39845.
- Visai, L.;Yanagisawa, N.;Josefsson, E.;Tarkowski, A.;Pezzali, I.;Rooijackers, S.H. y col. 2009. Immune evasion by *Staphylococcus aureus* conferred by iron-regulated surface determinant protein IsdH. *Microbiology* 155: 667-679.
- Wadstrom, T. y Mollby, R. 1971. Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. VII. Studies on -haemolysin. *Biochimica et biophysica acta* 242: 308-320.

- Wann, E.R.;Gurusiddappa, S. y Hook, M. 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. The Journal of biological chemistry 275: 13863-13871.
- Watanabe, M.;Tanaka, Y.;Suenaga, A.;Kuroda, M.;Yao, M.;Watanabe, N.y col. 2008. Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: the case of the third neat domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*. The Journal of biological chemistry 283: 28649-28659.
- Watson, D.L. 1992. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. Research in veterinary science 53: 346-353.
- Wattiaux, M. 2001. Mastitis: La enfermedad y su transmisión. Esenciales lecheras: Lactancia y Ordeño. Babcock Institute for International Dairy Research and Development, Universidad de Wisconsin, Madison, USA: 89-92.
- Watts, A.;Ke, D.;Wang, Q.;Pillay, A.;Nicholson-Weller, A. y Lee, J.C. 2005. *Staphylococcus aureus* strains that express serotype 5 or serotype 8 capsular polysaccharides differ in virulence. Infect. Immun 73: 3502-3511.
- Weingart, C.L.;Broitman-Maduro, G.;Dean, G.;Newman, S.;Peppler, M. y Weiss, A.A. 1999. Fluorescent labels influence phagocytosis of Bordetella pertussis by human neutrophils. Infection and immunity 67: 4264-4267.
- Wellnitz, O. y Kerr, D.E. 2004. Cryopreserved bovine mammary cells to model epithelial response to infection. Veterinary immunology and immunopathology 101: 191-202.
- Wilson, N.S.;Duell, P.;Yang, B.;Li, Y.;Marsters, S.;Koernig, S.y col. 2014. Inflammasome-dependent and -independent IL-18 production mediates immunity to the ISCOMATRIX adjuvant. Journal of immunology 192: 3259-3268.
- Wilson, N.S.;Yang, B.;Morelli, A.B.;Koernig, S.;Yang, A.;Loeser, S.y col. 2012. ISCOMATRIX vaccines mediate CD8+ T-cell cross-priming by a MyD88-dependent signaling pathway. Immunology and cell biology 90: 540-552.
- Williams, J.M.;Mayerhofer, H.J. y Brown, R.W. 1966. Clinical evaluation of a *Staphylococcus aureus* bacterin (polyvalent somatic antigen). Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC 61: 789-793.
- Williams, J.M.;Shipley, G.R.;Smith, G.L. y Gerber, D.L. 1975. A clinical evaluation of *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of staphylococcal mastitis in cows. Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC 70: 587-594.
- Wolter, W.;Castañeda, V.H.;Kloppert, B. y Zschoeck, M. 2002. La Mastitis Bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse, Universidad de Guadalajara, México: 1-68.
- Xiong, C.;O'Keefe, B.R.;Botos, I.;Wlodawer, A. y McMahon, J.B. 2006. Overexpression and purification of scytovirin, a potent, novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium Scytonema varium. Protein expression and purification 46: 233-239.
- Yancey, R.J., Jr. 1999. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. Advances in veterinary medicine 41: 257-273.
- Zapotoczna, M.;Heilbronner, S.;Speziale, P. y Foster, T.J. 2012. Iron-regulated surface determinant (Isd) proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. Journal of bacteriology 194: 6453-6467.
- Zecconi, A.;Hamann, J.;Bronzo, V.;Moroni, P.;Giovannini, G. y Piccinini, R. 2000. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. Advances in experimental medicine and biology 480: 287-293.

- Zetterlund, A.;Larsson, P.H.;Müller-Suur, C.;Palmberg, L. y Larsson, K. 1998. Budesonide but not terbutaline decreases phagocytosis in alveolarmacrophages. *Respir. Med* 92: 162–166.
- Zhou, H.;Xiong, Z.Y.;Li, H.P.;Zheng, Y.L. y Jiang, Y.Q. 2006. An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. *Vaccine* 24: 4830-4837.

Apéndice I:

Información y análisis complementarios

AI-1. TÉCNICAS DE CONJUGACIÓN DE POLISACÁRIDOS A PROTEÍNAS

AI-1-1. Mecanismos de reacción

Como se describió en la introducción del capítulo II [II-1], existen varias técnicas para la conjugación de polisacáridos a proteínas transportadoras. La ventaja de la metodología que emplea PBQ propuesta en este trabajo, es que es muy sencilla y permite el acoplamiento de los polisacáridos a proteínas, sin la formación de intermediarios complejos, lo cual facilita la obtención de buenos rendimientos de la reacción. Con el objetivo de enfatizar las complejidades técnicas que éstas implican, se describen a continuación los mecanismos de reacción de las metodologías más comúnmente usadas para el desarrollo de vacunas conjugadas, tanto experimentales como comerciales.

AI-1-1-1. Aminación reductiva

La aminación reductiva con cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3). En este método, los grupos aldehídos del polisacárido reaccionan con los amino de la proteína, formando una base de shiff [Kuo y Ree, 1996; Shen y col., 2001]. Luego, en presencia del agente reductor NaCNBH_3 se forma un enlace covalente, dando lugar a un conjugado estable.

AI-1-1-2. Conjugación con Cistamina y SPDP

Otro método emplea cistamina y succinimidil 3-(2-piridiltio) propionato (SPDP) como agente reticulante [Fattom y col., 1990; Bergquist y col., 1995]. Por un lado, el polisacárido se activa con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) ó 1-ciano-4-(dimetilamino)- piridinio (CDAP), ó cianobromuro (CNBr) para formar un intermediario con grupos hidroxilos reactivos. Posteriormente se incorporan grupos sulfhidrilos por reacción con cistamina, seguido de una reducción con ditionitriol (DTT). Por otro lado, también se derivatiza la proteína para incorporar grupos sulfhidrilos y finalmente se mezclan ambas moléculas modificadas que quedan unidas mediante un enlace disulfuro.

AI-1-1-3. Técnica del CDAP

Un tercer método, utiliza CDAP para modificar el polisacárido y el éster de cianato derivativo obtenido reacciona directamente con los grupos amino de la proteína formando un enlace covalente [Maira-Litran y col., 2005]. Una alternativa similar, derivatiza el polisacárido con EDAC, lo cual da lugar a la formación de un éster O-acilisourea reactivo, capaz de reaccionar con los grupos amino de la proteína transportadora [Shen y col., 2001].

AI-1-2. Antecedentes en el desarrollo de conjugados empleando las técnicas previamente descritas

Kuo y col., emplearon la técnica de aminación reductiva para acoplar diferentes polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* a la hemolisina de la misma bacteria [Kuo y Ree, 1996]. Los distintos conjugados obtenidos indujeron anticuerpos contra ambas componentes y confirieron inmunidad contra las enfermedades causadas por *S. pneumoniae*, al evaluarlas en un modelo murino. Laferriere y col., utilizaron el mismo método para conjugar fragmentos del polisacárido capsular de *S. pneumoniae* al toxoide tetánico [Laferriere y col., 1998]. Dichos conjugados, administrados vía subcutánea en conejos, produjeron anticuerpos específicos contra el polisacárido, que incrementarse con dosis sucesivas, lo cual sugiere el desarrollo de una respuesta inmune T-dependiente contra el conjugado y demuestra que la técnica de conjugación fue eficiente en potenciar las propiedades inmunogénicas de los polisacáridos.

En un estudio comparativo, los autores prepararon conjugados basados en el polisacárido capsular III del grupo B de *Streptococcus* (GBS) y la subunidad B recombinante de la toxina del cólera (rCTB), mediante tres técnicas: aminación reductiva, conjugación con cistamina y SPDP, y técnica del EDAC [Shen y col., 2001]. Luego inmunizaron ratones vía intranasal con cada uno de los inmunógenos producidos y evaluaron las respuestas humorales obtenidas. Las moléculas preparadas por aminación reductiva resultaron las más inmunogénicas, produciendo no sólo altos niveles de las subclases IgG₁, IgG_{2b} en suero, pulmones y vagina, sino también IgG_{2a} e IgG₃, que fijan complemento y promueven la opsonofagocitosis en ratones. El conjugado obtenido por la técnica del EDAC, si bien produjo altos niveles de IgG e IgA, la magnitud de la respuesta fue menor que la inducida por el conjugado anterior. Por último, el conjugado preparado con cistamina y SPDP falló en generar una buena respuesta anticuerpos. Contrario a dicho resultado, en otro trabajo en el que unieron dextranos a la rCTB utilizando dicha técnica, obtuvieron buenos títulos de IgA e IgG, respectivamente en pulmones y suero, al inmunizar ratones vía intranasal. En cambio, al aplicar los conjugados vía subcutánea u oral, sólo lograron estimular una respuesta local a nivel mucosas [Bergquist y col., 1995]. Estos resultados, evidencian la influencia del método de conjugación y de los protocolos de inmunización sobre las propiedades inmunogénicas de los conjugados y las respuestas inmunes inducidas. Como se discutió previamente en el capítulo IV, esto resalta la necesidad de optimizar las condiciones de vacunación para cada ensayo en particular, de manera de lograr estimular una respuesta inmune robusta.

Un ejemplo del uso de la metodología de conjugación empleando CDAP, es el trabajo de Maira-Litrán y col. [Maira-Litrán y col., 2005]. Prepararon conjugados de poli-N-acetil- β -(1,6)-glucosamina (PNAG) de *S. aureus* y toxoide diftérico (DT) y los administraron en forma subcutánea en conejos. La inmunización estimuló la producción de altos títulos de anticuerpos anti-PNAG respecto de los grupos control, capaces

de promover la fagocitosis de la bacteria. Además, la inmunización pasiva de ratones con sueros de conejos previamente obtenidos, permitió una eliminación efectiva de la bacteria y la protección de los animales frente a desafíos con diferentes cepas de *S. aureus*.

Del análisis de los antecedentes previamente comentados, se observa que hay varias metodologías para la conjugación de polisacáridos a proteínas, que resultan efectivas para conferir inmunogenicidad a los polisacáridos bacterianos. Sin embargo, el costo implicado y la complejidad de las metodologías, dificulta la producción a gran escala y encarece el producto. Esto motivó la búsqueda de otras metodologías para la conjugación de CP5 y CP8 de *S. aureus*, destinados a la formulación del inmunógeno multicomponente de interés en el presente trabajo. Los resultados del capítulo II, sugieren que la técnica que emplea PBQ, brinda una nueva alternativa para la obtención de conjugados inmunogénicos aplicados al desarrollo de vacunas efectivas y de bajo costo.

AI-2. CONTROL DE TRANSFERENCIA DE CP5 Y CP8 A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

Con el objetivo de buscar una explicación a la falta de bandas específicas en las calles de los polisacáridos, y descartar posibles problemas de reconocimiento por parte del suero empleado, se realizaron ensayos de dot blot. Estos experimentos se realizaron según la metodología empleada para los Western blot del capítulo II [II-3-2-2], pero la sensibilización de las membranas se llevó a cabo sembrando 1 μ l de cada muestra: los conjugados CP5-ASH_{PBQ}, CP8-ASH_{PBQ} y los polisacáridos nativos CP5 y CP8. En la figura 44 se expone el resultado de este ensayo. Se obtuvo revelado específico de las muestras de conjugado, mientras que los polisacáridos nuevamente no lograron ser visualizados. Esto demuestra problemas de adherencia de CP5 y CP8 a las membranas, y permite descartar inconvenientes durante la transferencia o de especificidad de los sueros empleados.

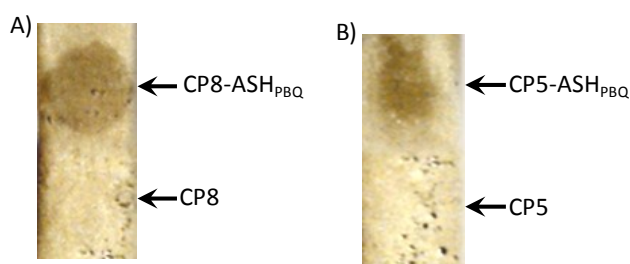


Figura 44. Ensayo de Dot blot. Las muestras de conjugados CP5-ASH_{PBQ} y CP8-ASH_{PBQ} y los polisacáridos nativos, se enfrentaron a los correspondientes sueros de conejo anti-CP5 y anti-CP8.

AI-3. EXTRACCIÓN DE Btox NATIVA A PARTIR DE *S. aureus*

AI-3-1. Selección de una cepa productora de Btox

En primer lugar se seleccionó una cepa productora únicamente de la toxina de interés siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos del capítulo IV [IV-2-4-1]. La cepa 226, aislada de un caso de mastitis subclínica en la provincia de Córdoba, mostró producción de Btox, pero no de α ni δ toxinas [Figura 45], por lo cual fue seleccionada para la obtención de la proteína de interés.

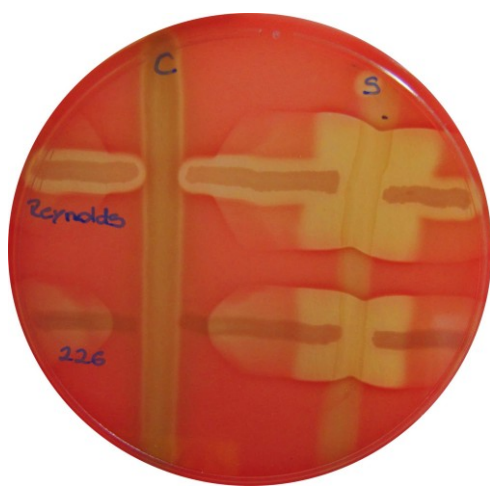


Figura 45. Evaluación de la producción de hemolisinas en cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovinas. Vertical izquierdo: *C. pseudotuberculosis*. Vertical derecho: *S. agalactiae*. Horizontal superior: cepa Reynolds de *S. aureus*, productora de Atox y Btox. Horizontal inferior: cepa 226 de *S. aureus*, productora de Btox.

AI-3-2. Control de la purificación de la Btox nativa

A partir de la cepa de *S. aureus* seleccionada anteriormente, se purificó la proteína nBtox [IV-2-4-1]. En la figura 46 se muestra el extracto de purificación obtenido, en el cual se puede identificar una banda de 33 KDa aproximadamente, correspondiente a la toxina nativa.

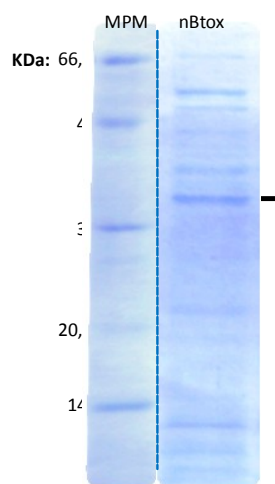


Figura 46. Purificación de la nBtox. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15% teñido con Coomassie. Se muestra el extracto de purificación de la nBtox. La flecha indica la banda correspondiente a la toxina beta.

AI-4. CONTROL DE LA PURIFICACIÓN DE FIBRINÓGENO A PARTIR DE PLASMA BOVINO

Empleando la técnica descrita en materiales y métodos del capítulo IV [IV-2-4-2], se consiguió extraer con éxito el fibrinógeno a partir de plasma bovino. Se obtuvieron 3 bandas correspondientes al Fg, de aproximadamente 60 KDa, 55 KDa y 45 KDa peso molecular [Figura 47]. Junto al Fg, se co-purificó una cantidad minoritaria de Fn.

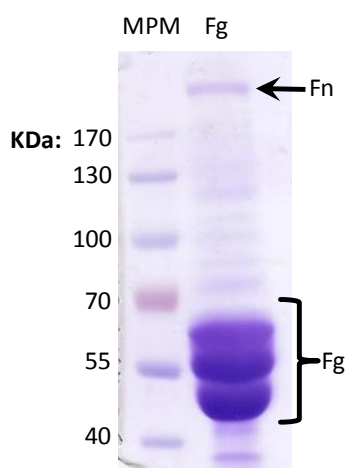


Figura 47. Purificación de Fibrinógeno (Fg) a partir de plasma bovino. SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie. El corchete remarca las 3 bandas correspondientes al Fg, mientras que la flecha indica la fibronectina (Fn) co-purificada.

AI-5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A Clf40

AI-5-1- Secuencia a amplificar por PCR

Se utilizó la secuencia con número de acceso al Genbank: Z18852, que corresponde a la secuencia completa de la proteína Clf. Se muestra resaltado el fragmento a clonar, Clf40. En verde se indican los sitios donde hibridan los oligonucleótidos diseñados [Tabla 5], el codón rojo representa el ATG de inicio de la traducción, y la secuencia subrayada, corresponde al dominio SdrG, presente en los extremos C-terminales de la familia de proteínas de unión a fibrinógeno. El tamaño molecular esperado del fragmento a amplificar es de 1569pb.

```

atgaaatgaagaaaaagaaaaacacgcaattcggaaaaaatcgaattggcgtggcctcagtgcttgtaggtacgttaatcggttt
tggactactcagcagtaaagaagcagatgcaagtgaatagtggttacgcaatcga tagcgcgaagtaacgaaagcaaaagtaatg
attcaagtagcgttagtgctgcacctaaaacagacgcacaaaacgtgagtgatactaaaacatcgtcaaaacactaataatggogaa
acgagtggtggcgcaaaatccagcacaacaggaacgacacaatcatcatcaacaaatgcaactacggaagaaacgcggtaactgg
tgaagctactactacgacaacgaa tcaagctaatacaccggcaacaactcaatcaagcaatacaaa tgcggaggaattagtgaatc
aaacaagtaatgaaacgacttttaatagatactaaatcacgatacatctgtaaattcacctcaaaattctcaaaatgcggaaaaatgtt
tcaacaacgcaagatacttcaactgaagcaacaccttcaaaacaatgaatcagctccacagagtacagatgcaagtaataaagatgtt
agttaatcaagcggtaataacaagtgcgcctagaatgagagcatttagtttagcggcagtagctgcagatgcaccggcagctggca
cagataattacgaatcagttgacgaatgtgacagttggattgactctgtgtacgactgtgtatccgcaccaagcagggttatgtcaaa
ctgaattatgggttttcagtgccctaaattctgctgttaaaggtgacacattcaaaa taactgtacctaagaattaaacttaaattgg
tgtaacttcaactgetaaagtgccaccaattatggctggagatcaagtatggcaaatgggtgtaatogatagtgtatggtaattgtta
tttatacatttacagactatgtaaaactaaagatgatgtaaaagcaactttgaccatgcccgttataattgaccctgaaaaatgtt
aaaaagacaggttaattgacattggctactggcataggttagtacaacagcaaaacaaacagatttagtagattatgaaaaatattgg
taagttttataacttatctattaaaggtacaattgacccaaatcga taaaacaaataa taogtatcgtcagacaaatttatgtcaatc
caagtgagataacgttattgcccgggttttaacaggttaattaaaacaaatcggatagtaattgcatatagatcagcaaaat
acaagtatataaagtaataaaagtagataatgcagctgatttatctgaaagtactttgtgaatccagaaaactttgaggtgtcac
taatagtggtgaatattacattcccaaatccaaatcaataataaagtagagtttaatacgcctgatgatacaaatcaacaccgtata
tagtagttgttaattgttcatttgatccgaaatagcaaaaggtgatttagctttacgttcaactttata tgggtataactogaataa
atttggcgtctatgtcatgggacaacgaagtagcatttaataacggatcaggttctggtgacggta tcgataaaccagttgttcc
tgaacaacctgatgagcctggtgaattgacccaatttcagagagattcagattctgacccaggttcagattctggcagcgattcta
attcagatagcggttcagattccggtagtgattctacatcagatagtggttcagattcagcagagtgattcagattcagcaagtgat
tcagactcagcagtgattcagattcagcaagcattccgactcagcagcagattccgactcagacaatgactcggattcagatag
cgattctgactcagacagtgactcagattccgacagtgactcagattcagatagcgattctgactcagacagtgactcagattcag
atagcagattcagattcagatagcgattcagattccgacagtgattccgactcagacagcgattctgactccgacagtgattccgac
tcagacagcgattcagattccgacagtgattccgactcagatagcgattccgactcagatagcgactcagattcagacagcgattc
agattcagacagcgattcagattcagatagcgattcagattccgacagtgactcagattccgacagtgactcggattcagatagcg
attcagattccgacagtgactcagattccgacagtgactcagactcagacagtgattccgattcagcagtgattccgattcagat
agtattccgactccgacagtgactcggattcagatagcgactcagactcggatagcgactcggattcagatagcgattccggactc
agatagcgattcagaatcagacagcgattcagaatcagacagcgattcagattcagacagcgactcagacagtgactcagattcag
atagtgactcggattcagcagtgattcagactcaggttagtgactccgattcatcaagtgattccgactcagaaagtgttcaaat
agcgattccgagtcaggttctaacaataatgttagttccgcctaaattcacctaaaaatggtaactaatgcttctaataaaaaatgaggc
taaagatagtaagaaccattaccagatacaggttctgaagatgaagcaaacgcctactaatttggggattattagcatcaaatag
gttcattactacttttcagaagaaaaaaagaaaaataaagataagaaataa
    
```


AI-5-2. Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy.

El resultado de la secuenciación de la construcción pET-32 conteniendo al fragmento Clf40 fue el siguiente:

```

NNNNNNNNNNCNNNNNGNGCTCTCCNTATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTACTAGTGAATTCGAAAAATAGTGTT
ACGCAATCTGATAGCGCAAGTAACGAAAGCAAAAGTAATGATTCAAGTAGCATTAAATGCTGCACCTAAAAACAGACAACACAAAACGT
GAGTGATACTAAACCAACGTCAAACACTAATAATGGCGAAACGAGTGTGGCGCAAAATCCAGCACAACAGGAAACGACACAATCAG
CATCAACAAATGCAACTACGGAAGAAAACGCCGGTAACTGGTGAAGCTACTACTACGACAACGAATCAAGCTAATACACCGGCAACA
ACTCAATCAAGCAATACAAATGCGGAGGAATTAGTGAATCAAACAAGTAATGAAACGACTTCTAATGATACTAATACAGTATCATC
TGTAATTCACCTCAAAATTTCTACAAATGCGGAAAAATGTTTCAACAACGCAAGATACTTCAACTGAAGCAACACCTTCAAACAATG
AATCAGCTCCACAGAGTACAGATGCAAGTAATAAAGATGTAGTTAATCAAGCGGTTAATACAAGTGCGCCTAGAAAGAGAGCATTT
AGTTTAGCGGCTGTAGCTGCAGATGCACCGGCAGCTGGCACAGATATTACGAATCAGTTGACAGATGTGAAAGTTACTATTGACTC
TGGTACGACTGTGTATCCGCACCAAGCAGGTTATGTCAAACCTGAATTATGGTTTTTTCAGTGCCTAATTTCTGCTGTTAAAGGTGACA
CATCAAAATAACTGTACCTAAAGAATTAACCTTAAATGGTGTAACTTCAACTGCTAAAGTGCCACCAATTATGGCTGGAGATCAA
GTATTGGCAAATGGTGTAAATCGATAGTGTATGGTAATGTATTTTATACATTTACAGACTATGTTGATAATAAAGAAAATGTAACAGC
TAATATTACTATGCCAGCTTATATTGACCCTGAAAAATGTTACAAAGACAGGTAATGTGACATTGACAACCTGGCATAGGAACCAATA
CTGCTAGTAAGACAGTATTAATCGACTATGAGAAATATGGACAATCCATAATTTATCAATTAAGGTACGATTGATCAAATCGAT
AAAACAAATAATACGTATCGCCAAACAATTTATGTCAATCCAAGCGGAGATAACGTTGTGTTACCTGCCTAACAGGTAATTTAAT
TCCTAATACAAAGAGTAATGCGTTAATAGATGCAAAAAACACTGATATTAAGTTTATAGAGTCGATAATGCTAATGATTATCTG
AAAGTTATTATGTGAATCCTAGCGATTTTGAAGATGTAACATAATCAAGTTAGAATTTCAATTTCCAAATGCTAATCAATACAAAGTA
GAATTTCCCTACGGACGATGACCAAATTACAACACCGTATATTGTAGTTGTTAATGGCCATATTGATCCTGCTAGTACAGGTGATTT
AGCACTACGTTTCGACATTTTATGGTTATGATTCTAATTTTATATGGAGATCTATGTATGGGACAACGAAGTAGCATTTAATAACG
GATCAGGTTCTGGTACGGTATCGATAAACAGTTGTTCTGAACAACCTGATGAGCCTGGTGAAATTTGAACCAATTCAGAGGTC
GACAATCACTACTGAACGCGGCCCTGCAGGTCGACCATNGGGAGAGCNCNNNNNGCNNNNNNNNN

```

La secuencia resaltada en amarillo corresponde a la del fragmento de interés, mientras que los nucleótidos que se encuentra por fuera de dicha secuencia corresponden al vector de clonado. El resultado de la secuenciación se comparó con las secuencias indexadas en el GeneBank, empleando la herramienta BLAST®. Al final del apartado, en la figura 48 se muestra como ejemplo, uno de los alineamientos obtenidos para Clf40. Cabe destacar que no se encontraron mutaciones en el fragmento obtenido, y alineó específicamente con secuencias identificadas como *clumping factor A* ó proteína de unión a fibrinógeno.

Staphylococcus aureus strain H112, clumping factor A (clfA) gene, partial cds
 Sequence ID: [gb|HQ424258.1](#) Length: 1677 Number of Matches: 1

Range 1: 121 to 1677 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--|-----------------|------------|-----------|
| 2876 bits(1557) | 0.0 | 1557/1557(100%) | 0/1557(0%) | Plus/Plus |
| Query 7 | GAAAATAGTGTTACGCAATCTGATAGCGCAAGTAACGAAAGCAAAAAGTAATGATTCAAGT | | | 66 |
| Sbjct 121 | GAAAATAGTGTTACGCAATCTGATAGCGCAAGTAACGAAAGCAAAAAGTAATGATTCAAGT | | | 180 |
| Query 67 | AGCATTAAATGCTGCACCTAAAACAGACAAACACAAACGTGAGTGATACTAAACCAACGTCA | | | 126 |
| Sbjct 181 | AGCATTAAATGCTGCACCTAAAACAGACAAACACAAACGTGAGTGATACTAAACCAACGTCA | | | 240 |
| Query 127 | AACACTAATAATGGCGAAACGAGTGTGGCGCAAAATCCAGCACAACAGGAAACGCACAAA | | | 186 |
| Sbjct 241 | AACACTAATAATGGCGAAACGAGTGTGGCGCAAAATCCAGCACAACAGGAAACGCACAAA | | | 300 |
| Query 187 | TCAGCATCAACAAATGCAACTACGGAAGAAACGCGGTAACGGTGAAGTACTACTACTCG | | | 246 |
| Sbjct 301 | TCAGCATCAACAAATGCAACTACGGAAGAAACGCGGTAACGGTGAAGTACTACTACTCG | | | 360 |
| Query 247 | ACAACGAATCAAGCTAATACACCGGCAACAACTCAATCAAGCAATACAAATGCGGAGGAA | | | 306 |
| Sbjct 361 | ACAACGAATCAAGCTAATACACCGGCAACAACTCAATCAAGCAATACAAATGCGGAGGAA | | | 420 |
| Query 307 | TTAGTGAATCAACAAAGTAATGAAACGACTTCTAATGATACTAATACAGTATCATCTGTA | | | 366 |
| Sbjct 421 | TTAGTGAATCAACAAAGTAATGAAACGACTTCTAATGATACTAATACAGTATCATCTGTA | | | 480 |
| Query 367 | AATTCACCTCAAAAATCTACAAATGCGGAAAATGTTTCAACACGCAAGATACTTCAACT | | | 426 |
| Sbjct 481 | AATTCACCTCAAAAATCTACAAATGCGGAAAATGTTTCAACACGCAAGATACTTCAACT | | | 540 |
| Query 427 | GAAGCAACACCTTCAAAACAATGAATCAGCTCCACAGAGTACAGATGCAAGTAATAAAGAT | | | 486 |
| Sbjct 541 | GAAGCAACACCTTCAAAACAATGAATCAGCTCCACAGAGTACAGATGCAAGTAATAAAGAT | | | 600 |
| Query 487 | GTAGTTAATCAAGCGGTTAATACAAGTGCGCCTAGAAAAGAGAGCAITTTAGTTTAGCGCT | | | 546 |
| Sbjct 601 | GTAGTTAATCAAGCGGTTAATACAAGTGCGCCTAGAAAAGAGAGCAITTTAGTTTAGCGCT | | | 660 |
| Query 607 | GTTACTATTGACTCTGGTACGACTGTGTATCCGCACCAAGCAGGTTATGTCAAACTGAAT | | | 666 |
| Sbjct 721 | GTTACTATTGACTCTGGTACGACTGTGTATCCGCACCAAGCAGGTTATGTCAAACTGAAT | | | 780 |
| Query 667 | TATGGTTTTTCAGTGCCTAATCTGCTGTTAAAGGTGACACATTCAAAAATCACTGTACCT | | | 726 |
| Sbjct 781 | TATGGTTTTTCAGTGCCTAATCTGCTGTTAAAGGTGACACATTCAAAAATCACTGTACCT | | | 840 |
| Query 727 | AAAGAAATAAATTAATGGTGAATTCACACTGCTAAAGTGCCACCAATTTATGGCTGGA | | | 786 |
| Sbjct 841 | AAAGAAATAAATTAATGGTGAATTCACACTGCTAAAGTGCCACCAATTTATGGCTGGA | | | 900 |
| Query 787 | GATCAAGTATTGGCAAATGGTGAATCGATAGTGAATGTTATTTATACATTACA | | | 846 |
| Sbjct 901 | GATCAAGTATTGGCAAATGGTGAATCGATAGTGAATGTTATTTATACATTACA | | | 960 |
| Query 847 | GACTATGTTGATAATAAAGAAAATGTAACAGCTAATATTACTATGCCAGCTTATATTGAC | | | 906 |
| Sbjct 961 | GACTATGTTGATAATAAAGAAAATGTAACAGCTAATATTACTATGCCAGCTTATATTGAC | | | 1020 |
| Query 907 | CCTGAAAATGTTACAAAGACAGGTAATGTGACATTGACAACCTGGCATAGGAACCAATCT | | | 966 |
| Sbjct 1021 | CCTGAAAATGTTACAAAGACAGGTAATGTGACATTGACAACCTGGCATAGGAACCAATCT | | | 1080 |
| Query 967 | GCTAGTAAGACAGTATTAAATCGACTATGAGAAAATGGACAATCCATAAATTTATCAAIT | | | 1026 |
| Sbjct 1081 | GCTAGTAAGACAGTATTAAATCGACTATGAGAAAATGGACAATCCATAAATTTATCAAIT | | | 1140 |
| Query 1027 | AAAGGTACGATTGATCAAAATCGATAAAAACAATAACGTATCGCCAAACAAATTTATGTC | | | 1086 |
| Sbjct 1141 | AAAGGTACGATTGATCAAAATCGATAAAAACAATAACGTATCGCCAAACAAATTTATGTC | | | 1200 |
| Query 1087 | AATCCAAGCGGAGATAACGTTGTGTTACCTGCCTTAACAGGTAATTTAATTCCTAATACA | | | 1146 |
| Sbjct 1201 | AATCCAAGCGGAGATAACGTTGTGTTACCTGCCTTAACAGGTAATTTAATTCCTAATACA | | | 1260 |
| Query 1147 | AAGAGTAATGCGTTAATAGATGCAAAAACACTGATATTAAGTTTATAGAGTCGATAAT | | | 1206 |
| Sbjct 1261 | AAGAGTAATGCGTTAATAGATGCAAAAACACTGATATTAAGTTTATAGAGTCGATAAT | | | 1320 |
| Query 1207 | GCTAATGATTTATCTGAAAGTTATATGTGAATCCTAGCGATTTGAAAGTGAACATAAT | | | 1266 |
| Sbjct 1321 | GCTAATGATTTATCTGAAAGTTATATGTGAATCCTAGCGATTTGAAAGTGAACATAAT | | | 1380 |
| Query 1267 | CAAGTTAGAAATTTCAATTCCAAATGCTAATCAATACAAAGTAGAAATTCCTACGGACGAT | | | 1326 |
| Sbjct 1381 | CAAGTTAGAAATTTCAATTCCAAATGCTAATCAATACAAAGTAGAAATTCCTACGGACGAT | | | 1440 |
| Query 1327 | GACCAAATTACAACCCGTATATTGTAGTTGTTAATGGCCATATTGATCCTGCTAGTACA | | | 1386 |
| Sbjct 1441 | GACCAAATTACAACCCGTATATTGTAGTTGTTAATGGCCATATTGATCCTGCTAGTACA | | | 1500 |
| Query 1387 | GGTGATTTAGCACTACGTTGACATTTTATGGTTATGATTCTAATTTATATGGAGATCT | | | 1446 |
| Sbjct 1501 | GGTGATTTAGCACTACGTTGACATTTTATGGTTATGATTCTAATTTATATGGAGATCT | | | 1560 |
| Query 1447 | ATGTCATGGGACAACGAAGTAGCAITTTAATAACGGATCAGGTTCTGGTGACGGTATCGAT | | | 1506 |
| Sbjct 1561 | ATGTCATGGGACAACGAAGTAGCAITTTAATAACGGATCAGGTTCTGGTGACGGTATCGAT | | | 1620 |
| Query 1507 | AAACCAGTTGTTCTGAAACACCTGATGAGCCTGGTAAAATGAACCAATTCAGAG | | | 1563 |
| Sbjct 1621 | AAACCAGTTGTTCTGAAACACCTGATGAGCCTGGTAAAATGAACCAATTCAGAG | | | 1677 |

Figura 48. Ejemplo del alineamiento de la secuencia de Clf40 clonada en el vector pGEM T-easy, utilizando el programa BLAST®. En amarillo se resaltan la descripción de la secuencia con la que alinea, y el porcentaje de identidad.

AI-6. ANÁLISIS DE SECUENCIAS CORRESPONDIENTES A FnBPD1-3

AI-6-1. Secuencia a amplificar por PCR

La secuencia con número de acceso: AJ629121.1, correspondiente a la secuencia parcial de la proteína FnBP A, fue la empleada para el diseño de los cebadores [Tabla 5]. La secuencia resaltada corresponde al fragmento deseado, FnBPD1-3, en verde se señalan los sitios donde hibridan los oligonucleótidos usados en la PCR, y en rojo se muestra el codón de inicio de la traducción. El tamaño esperado de la secuencia a amplificar es de 409pb.

```

aaaacaatccttagtgacggcattagaaaacataaattgggagcagcatcagttattccttaggaacaatgatcgttggtgggatggga
caagacaaagaagctgcagcatcagaacaaaagacaactacagtagaagaaaatgggaattcagctactgataataaaacaagtga
aacacaaacaactgcaactaacgttaatcatatagaagaaactcaatcatataacgcaacagtaacagaacaaccgtcaaacgcaa
cacaagtaacaactgaagaagcaccaaaagcagtagacaagcaccacaaactgcacaaccagcaaatatagaaacagttaaagaagag
gtagttaaggaagaagcgaaacctcaagttaaggaaacaacacaatctcaagacaatagcggagatcaaagacaagtagatttaac
acctaaaaaggctacacaaaatcaagtcgcagaaacacaagttgaagtggcacagccaagaacggcatcagaaaagtaagccacgtg
tgacaagatcagcagatgtagcggagctaaggaagctagtaacgcgaaagtggaaacgggtacagatgtaacaagtaaaagttaca
gtagaaattggttctattgaggggcataacaatacaaaataaagtagaacctcatgcaggacaacgagcgggtactaaaataaagtt
gaaatttgagaatggtttacatcaaggtgactactttgactttactttatcaaataatgtaaacgcgatggcgtatcaactgcta
gaaaagtaccagaaattaaaaatggttcagtcgtaattggcgacaggtgaagttttagaaggtggaaagattagatatacatattaca
aatgatattgaagataaggttgatgtaacggctgaactagaaattaattttatttattgatcctaaaactgtacaaactaatggaaa
tcaactataacttcaactaaatgaagaacaaacttcaaaggaattagatgttaaatataaagatggtattgggaattattatg
ccaatttaaatggatcgattgagacatttaataaagcgaataatagattttcgcatggtgcattttataaacctaataatggtaaa
acgacaagtggtgactgttactggaaactttaatgaaaggtagtaatcagaatggaaatcaacccaaaaggttaggatatttgaactt
gggtaataatgaagacatagcgaagagtgatatgcaaaatcgacagatacttctaaatttaagaagtcaaaagtaatatgagtg
ggaatttgaaatttcaaaaataatggaagctattcattgaatatagaaaacttagataaaaacttatggtgttccactatgatggagag
tatttaaatggtactgatgaagttgatttttagaacacaaatggtaggacatccagagcaactttataagattattatgatagagg
atataccttaacttgggataatggttagtttatacagtaataaagcgaacggaaatgggaaaaatggtccgattattcaaaaata
ataaattgaaatataaagaagatacaattaaagaaactcttacaggtcaatatgataagaatttagtaactactggtgaagaggaa
tatgattcatcaactcttgacattgattaccacacagctatagatggtggaggtggatatggtgatggatacattgaaacaataga
agaaacggattcatcagctattgatatcgattaccatactgctgtggatagcgaagcaggtcacggttgaggatacactgagtcct
ctgaggaatcaaatccaattgactttgagaatcgacacatgaaaattcaaaacatcatgctgatggtgtgaaatgaagaagat
acaaaccaggtggtggtcaggttactactgagtcctaacctagttgaatttgacgaagattctacaaaaggtattgtaactggtgc
tgttagcgatcatacaacaattgaagatacgaagaatatacgactgaaagtaactgattgaaactagtagatgaaactacctgaag
aacatggtcaagcgaaggaccaatcgaggaaattactgaaaacaatcatcatatttctcattctggttaggaactgaaaatggt
cacggttaattatggcgtgattgaagaaatcgaagaaaatagccacgtggatattaagagtgaaattaggttaggaaatgggacaaa
cagcggatcattcagtcatttgaggaagacagagaagaagataaaaccgaaatatgaaacaaggtggcaatatcgtagatatcgatttcg
atagtgtagctcctcaaatcatggttcaaaaataatggtaaccaatcattcgaagaagatacagagaaagacaaaacctagtagtaacaa
ggtggtaatatcattgatatcgacttcgacagtggtgccacatattcagcggattcaataagcacactgaaattattgaaagaagatac
aaataaagataaaacaaattatcaattcgggtggacacaatagtggtgactttgaaagaagatacacttccacaagtaagtggtcata
atgaaggtcaacaaacgattgaagatgatacaacaacttcaactcgtgccaccaacgccaccgacaccagaagtaccaagcgagccg
gaaacaccaacaccaccgacaccagaagtagcaagcgagccggaacaccaacaccgccaacgccagaggtaccaactgaaacctgg
taaaccaataaccacctgctaaagaagaacctaaaaaaccttcaaacctggaacaaggtaaagtagtaaacacctgattattgaaa
    
```

tcaatgaaaagggttaaagcagtggtaccaactaaaaaagcacaatctaagaaatctgaactacctgaaacaggtggagaagaatca
 acaaaacaacggcatgttggtcgcggtattattagcattctaggttagcattattacgcagaaataaaaagaatcacaagcata
 attaaacaaaaattgacgggtttatcataaattatagagtaagcctgtttttttatattaatcaaatttctaatagaaaat
 tagagtgttttctgattgcttcattggttagatcttcg

AI-6-2. Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy.

El resultado de la secuenciación del fragmento correspondiente a FnBPD1-3 fue el siguiente:

NNNNNNNNNNNNNANGCGTNGGGANNNTCCNNTATGGTTCGACCTGCAGGCGCCGCGAATTCAGTGTGATTGAATTCGGTGGC
 CAAAATAGCGGTAATCAGTCATTTCGAGGAAGACACAGAAGAAGATAAACCGAAATATGAACAAGGTGGCAATATCGTAGATATCGA
 TTTCGATAGTGTACCTCAAATCCAAGGTCAAATAATGGTGACCAAGTCATTTCGAGGAAGACACAGAAGAAGACAAACCTAAGTATG
 AACAAAGGTGGTAATATCATTGATATCGACTTCGATAGTGTGCCACATATTCATGGATTCAATAAGCACACTGAAATTATTGAAGAA
 GATACAAACAAAGATAAACCTAATTATCAATTCCGGTGGACACAGTAGTGTGACTTTGAAGAAGATACACTCCACAAGTAAGTGG
 TCATAATGAAGGTCAACAAACGATTGAAGAAGATACAACACCTCCAATCGTGCCACCAAATCGACAAATCGANTTCCCAGCGCCGCC
 ATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTC
 GTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCC
 CGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTG
 GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTT
 CGCCGCTTTCCCCTCNAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTNCGATTTAGTGCTTTACNGNCANCNTCGACCCCNAAA
 AACNNGNNTTANGNNATNNNNNCGNNNNNNNNNNNTCNNNCNNANNGNNGNNTNTNNNNNNNTTNNANNNNNNNNNNCNNNN
 NNN

La secuencia resaltada en amarillo corresponde a la del fragmento de interés, mientras que por fuera se muestra la secuencia del vector de clonado. El resultado de la secuenciación se comparó con las secuencias indexadas en el GeneBank, empleando la herramienta BLAST®. En la figura 49 se muestra como ejemplo, uno de los alineamientos obtenidos. Se encontraron algunas mutaciones en la secuencia, pero son coherentes con la variabilidad de la proteína entre los diferentes aislamientos y cepas. La secuencia mostró alineamiento específico con proteínas de unión a fibronectina A y B.

Range 2: 2639205 to 2639613 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|--------------|-----------|------------|
| 678 bits(367) | 0.0 | 395/409(97%) | 0/409(0%) | Plus/Minus |

Features: [C-terminal part of fibronectin binding protein A](#)

```

Query 7      GGTGGCCAAAATAGCGGTAATCAGTCATTGAGGAAGACACAGAAGAGATAAACCGAAA 66
          |||
Sbjct 2639613 GGTGGCCAAAATAGCGGTAATCAGTCATTGAGGAAGACACAGAAGAGATAAACCGAAA 2639554

Query 67     TATGAACAAGGTGGCAATATCGTAGATATCGATTCGATAGTGTACCTCAAATCCAAGGT 126
          |||
Sbjct 2639553 TATGAACAAGGTGGCAATATCGTAGATATCGATTCGATAGTGTACCTCAAATCCAAGGT 2639494

Query 127    CAAAATAATGGTGACCAGTCATTGAGGAAGACACAGAAGAGACAAACCTAAGTATGAA 186
          |||
Sbjct 2639493 CAAAATAATGGTAACCAATCATTGAGGAAGATACAGAGAAAGACAAACCTAAGTATGAA 2639434

Query 187    CAAGGTGGTAATATCATTGATATCGACTTCGATAGTGTGCCACATATTCATGGATTCAAT 246
          |||
Sbjct 2639433 CAAGGTGGTAATATCATTGATATCGACTTCGACAGTGTGCCACATATTCACGGATTCAAT 2639374

Query 247    AAGCACACTGAAATTATTGAAGAAGATACAAACAAAGATAAACCTAATTATCAATTCGGT 306
          |||
Sbjct 2639373 AAGCACACTGAAATTATTGAAGAAGATACAAATAAAGATAAACCTAATTATCAATTCGGT 2639314

Query 307    GGACACAGTAGTGTGACTTTGAAGAAGATACACTTCCACAAGTAAGTGGTCATAATGAA 366
          |||
Sbjct 2639313 GGACACAATAGTGTGACTTTGAAGAAGATACACTTCCACAAGTAAGTGGTCATAATGAA 2639254

Query 367    GGTCAACAAACGATTGAAGAAGATACAACACCTCCCAATCGTGCCACCAA 415
          |||
Sbjct 2639253 GGTCAACAAACGATTGAAGAAGATACAACACCTCCCAATCGTGCCACCAA 2639205
    
```

Figura 49. Ejemplo del alineamiento de la secuencia de FnBPD1-3 clonada en el vector pGEM T-easy, utilizando el programa BLAST®. En amarillo se resaltan la descripción de la secuencia con la que alinea y el porcentaje de identidad.

AI-7. SECUENCIA CORRESPONDIENTE A IsdHN1-2.

AI-7-1. Secuencia a amplificar por PCR

Para el armado de los cebadores se usó la secuencia con número de acceso: AP009351.1. La secuencia resaltada corresponde al fragmento de interés, IsdHN1-2, en verde se señalan los sitios donde hibridan los oligonucleótidos usados en la PCR [Tabla 5], y en rojo se muestra el codón de inicio de la traducción. También se subrayaron los 3 dominios NEAT de unión a hierro. El tamaño esperado del fragmento a obtener es de 1186pb.

atgaaacaatcaccctaaatgaagctcttctattcttagaaaaatcaactctaggcgttgatcgcgtcattgtcagtaacatttttaattacttctcaacatcaagcacaagcagca
 gaaaatacaaaactctcagataaaaatctcgaaaatcaaaaataaatgcaactcaactcagccacctaaggatacaaatcaaacacacctgtcagcaaccagcaaaataga
 aaaaatcctgcagcggatgaatcacttaaagatgcaataaagatcctgcattagaaaaataagaacaatgatataggccaagagaacaagtcaattccagttattagataaaaa
 caatgaaaacgcagtaactcacttttccagcatcaaagatccagcagatgtgattacataaaaaagaaagcagaagtgaattagacatcaatactgctcaacatggaagaaagtgtga
 agtctatgaaaacaatcaaaaatgccagtgagactgtatcatatagtctgtaccagaagaccatgctatattcgattcccagtttcagatggcacaagaatgaaatgtttctt
 cgactcaaatgatgatggagaagaaacaattatgattatacctaaatgtatgttctaaacatttataacgatccttcaactgttaaaatcagatatacaaatgatcagtagtaacgaa
 tgatcaatcaagttcagtcgcaagtaatacaacaacacgaatacatcctaaatacaatacaacgatcaacaatgcttaataatcaaccgcaggcaaccgaccaatgatgtaaacctt
 cacaacaaaatcgtcaacgaatgcagatcaagcgtcaagccaaccagctcatgaaacaaattctaattggaataactaacgataaaaacgaatgagtaacgattcaacatggaagaaattga
 tcaacagatccaccagcagatgaatcactacaagatgcaatataaaaccggctcatcagataaagaacatacagctgataaattggcgaccaattgattttcaaatgaaaaatgata
 aaggtaaagacagttctatcattatgctagtactgtgaaccagcaactgtcattttcaaaaaacaggaccaataatgaattaggtttaaagacagcttcaacatggaagaaattga
 agtttatgaaggtagcaaaaagtaccagtcgaattagatcatatgattctgataaagattatgcctatatcgtttcccagatcctaattggtacagagaagttaaaattgtgtcatctat
 tgaatatggtgagaacatccatgaagcatgattatagcctaattgtctgtgacagcctattactaataaccacaaaactatgaaagaaacatgaaacatacaattcaaaaaattatta
 gctcgtatcacaagcctaaacgttagaaagacaagtttagaattagaaaaattacaagagaattgccagaaaaataaaggcgaatataaaaagaattagatcaaactaga
 gtagagttagctgatcaagttaaatcagcagtgacggaattgaaaattgtacacctacaaaatgatcaattaacagatttacaagaagcagctttgtgtttgaaagtgaagaaaata
 gtgagtcagttatggcagcgtttgttgaacatccattctatacagcaactttaaattggtcaaaaaatagtagtgatgaaaaaaaaggatgacagttactggaagatttaattgtagaagg
 taaacgtgtcactactgtttctaaagatcctaaaaataatctagaacgctgattttcccatatatactgcaaaagcagtttacaatgctgattgtaaagtctgtgtggcaaacattggtta
 tgaaggtaaatcatgtcagaattataatcaggatatacaaaaagatgatgatacatcacaataaacagagtgaaaccgctaataatgtaaaaacaggacaagaaggtaaggtt
 gctgatacagatgtagctgaaaatagcagcactgcaacaaatcctaaagatgcgtctgataaagcagatgtgatagaaccagagctgagctggttaaagatgctgataataattga
 taaagatgtgcaacatgatgtgatcattatccgatatgtcggataataatcactcagataaaatgattttaaagaaatggatactcaaatgcaaaagatcagtagaagatgtggat
 aaagatgccgataatagctgttgatgtcatcattatgtcgataactgataaaagcctataaaaaataaagacaagtcatacagctgaaatcattgccgataaaaataatcactgga
 aaagcagcaaaagcgtgacgtgtaaaaaaattataataacagcaaaagttactgacaaaaaacactgaaacatcgtccgagtgatataaaaactgtagataaaaacagtgta
 aaacaaaagaaaagcggcacacatcgaagaaaacaaacttagtcaatcctaaatgctacaaaaactggagaacaactcaagccaatcatggtggggcttatatgctgtatt
 agtatgttagctttatctcctaaatcagaaaagaatctaataa

AI-7-2. Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy.

El resultado de la secuenciación del fragmento correspondiente a IsdH fue el siguiente:

NNNTTCNTATGGTCGNNTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTGAATTCCTTGGTT
 GTGCAGGTTGGAATTCAACTGCGAAAACTATCCTGCAGCGGATGAATCACTTAAAGATGCAATTAAGATCCTGCATTAGAAA
 ATAAAGAACATGATATAGGTC AAGAGAACAAGTCAATTTCCAGTTATTAGATAAAAACAATGAAACGCAGTACTATCACTTTTTTC
 AGCATCAAAGATCCAGCAGATGTGTATTACACTAAAAAGAAAGCAGAAGTTGAATTAGACATCAATACTGCTTCAACATGGAAGAA
 GTTTGAAGTCTATGAAAACAATCAAAAATTGCCAGTGAGACTTGATCATATAGTCTGTACCAGAAGACCATGCCTATATTCGAT
 TCCCAGTTTCAGATGGCACACAAGAATTGAAAATTGTTTCTTCGACTCAAATTTGATGATGGAGAAGAAAACAATTTATGATTATACT
 AAATTAGTATTTGCTAAACCTATTTATAACGATCCTTCACTTGTAATAATCAGATACAAATGATGCAGTAGTAACGAATGATCAATC
 AAGTTCACTCGCAAGTAAATCAAAACAACACGAATACATCTAAATCAAAAATACATCAACGATCAACAATGCTAATAATCAACCGCAGG
 CAACGACCAATATGAGTCAACCTGCACAACCAAAAATCGTCAACGAATGCAGATCAAGCGTCAAGCCAACCGCTCATGAAACAAAT

TCTAATGGTAATACTAACGATAAAACGAATGAGTCAAGTAATCAGTCGGATGTTAATCAACAGTATCCACCAGCAGATGAATCACT
 ACAAGATGCAATTAAAAACCCGGCTATCATCGATAAAGAACATACAGCTGATAATTGGCGACCAATTGATTTTCAAATGAAAAATG
 ATAAAGGTGAAAGACAGTTCTATCATTTATGCTAGTACTGTTGAACCAGCAACTGTCATTTTACAAAAACAGGACCAATAATTGAA
 TTAGGTTTAAAGACAGCTTCAACATGGAAGAAATTTGAAAGTTTATGAAGGTGACAAAAAGTTACCAGTCGAATTAGTATCATATGA
 TTCTGATAAAGATTATGCCTATATTCGTTTCCCAGTATCTAATGGTACGAGAGAAGTTAAAATTGTGTCATCTATTGAATATGGTG
 AGAACATCCATGAAGACTATGATTATACGCTAATGGTCTTTGCACAGCCTATTACTAATAAACCAGACGACTATGTGGATGAA GTC
 GACAAATCGANTTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATT
 CACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCC
 AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGC
 GGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACCTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTT
 CTCCCTTCCTTTCGCGCACGTTCCGCCGCTTTCGCCGTCNAGCTCTAAATCGGGNNGNNTTANGNNNATNNNNNN

Resaltado en amarillo se visualiza la secuencia de interés, y por fuera de dicha región se muestra la secuencia del vector de clonado. El resultado de la secuenciación se comparó con las secuencias indexadas en el GeneBank, empleando la herramienta BLAST®. En la figura 50 se muestra un ejemplo del alineamiento, donde puede observarse que el fragmento clonado no presentó mutaciones y alineó con secuencias descritas como IsdH, ó dominio de membrana de unión a haptoglobina (HarA), ó proteína de membrana asociada al transporte de hierro, etc.

Range 1: 1929708 to 1930892 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--------|-----------------------|------------|------------|
| 2189 bits(1185) | 0.0 | 1185/1185 100% | 0/1185(0%) | Plus/Minus |

Features: [Iron-regulated surface determinant protein H](#)

```

Query 103      AACACTGCGAAAACTATCCTGCAGCGGATGAATCACTTAAAGATGCAATTAAGATCCT 162
                |||
Sbjct 1930892 AACACTGCGAAAACTATCCTGCAGCGGATGAATCACTTAAAGATGCAATTAAGATCCT 1930833

Query 163      GCATTAGAAAATAAAGAACATGATATAGGTCCAAGAGAACCAAGTCAATTTCCAGTTATTA 222
                |||
Sbjct 1930832 GCATTAGAAAATAAAGAACATGATATAGGTCCAAGAGAACCAAGTCAATTTCCAGTTATTA 1930773

Query 223      GATAAAAACAATGAAACGCGAGTACTATCACTTTTTTCAGCATCAAAGATCCAGCAGATGTG 282
                |||
Sbjct 1930772 GATAAAAACAATGAAACGCGAGTACTATCACTTTTTTCAGCATCAAAGATCCAGCAGATGTG 1930713

Query 283      TATTACACTAAAAAGAAAGCAGAAGTTGAATTAGACATCAACTACTGCTTCAACATGGGAG 342
                |||
Sbjct 1930712 TATTACACTAAAAAGAAAGCAGAAGTTGAATTAGACATCAACTACTGCTTCAACATGGGAG 1930653

Query 343      AAGTTTGAAGTCTATGAAAACAATCAAAAATTGCCAGTGGAGACTTGTATCATATAGTCCT 402
                |||
Sbjct 1930652 AAGTTTGAAGTCTATGAAAACAATCAAAAATTGCCAGTGGAGACTTGTATCATATAGTCCT 1930593

Query 403      GTACCAGAAGACCATGCCTATATTCGATTCCCAGTTTCAGATGGCACACAAGAATTGAAA 462
                |||
Sbjct 1930592 GTACCAGAAGACCATGCCTATATTCGATTCCCAGTTTCAGATGGCACACAAGAATTGAAA 1930533

Query 463      ATTGTTTCTTCGACTCAAATGATGATGGAGAAGAAACAATATGATTATACTAAATTA 522
                |||
Sbjct 1930532 ATTGTTTCTTCGACTCAAATGATGATGGAGAAGAAACAATATGATTATACTAAATTA 1930473

Query 523      GTATTTGCTAAACCTAITTATAACGATCCTTCACITGTAAAAATCAGATACAAATGATGCA 582
                |||
Sbjct 1930472 GTATTTGCTAAACCTAITTATAACGATCCTTCACITGTAAAAATCAGATACAAATGATGCA 1930413

Query 583      GTAGTAACGAATGATCAATCAAGTTCAGTCGCAAGTAATCAAACAACACGAATACATCT 642
                |||
Sbjct 1930412 GTAGTAACGAATGATCAATCAAGTTCAGTCGCAAGTAATCAAACAACACGAATACATCT 1930353

Query 643      AATCAAAATACATCAACGATCAACAATGCTAATAATCAACCGCAGGCAACGACCAATATG 702
                |||
Sbjct 1930352 AATCAAAATACATCAACGATCAACAATGCTAATAATCAACCGCAGGCAACGACCAATATG 1930293

Query 703      AGTCAACCTGCACAACAAAATCGTCAACGAATGCAGATCAAGCGTCAAGCCAACAGCT 762
                |||
Sbjct 1930292 AGTCAACCTGCACAACAAAATCGTCAACGAATGCAGATCAAGCGTCAAGCCAACAGCT 1930233

Query 763      CATGAAAACAATTTCTAATGGTAATACTAACGATAAAAACGAATGAGTCAAGTAAATCAGTCG 822
                |||
Sbjct 1930232 CATGAAAACAATTTCTAATGGTAATACTAACGATAAAAACGAATGAGTCAAGTAAATCAGTCG 1930173

Query 823      GATGTTAATCAACAGTATCCACCAGCAGATGAATCACTACAAGATGCAATTAAGAACCCG 882
                |||
Sbjct 1930172 GATGTTAATCAACAGTATCCACCAGCAGATGAATCACTACAAGATGCAATTAAGAACCCG 1930113

Query 883      GCTATCATCGATAAAGAACATACAGCTGATAAATGGCGACCAATTGATTTTCAAATGAAA 942
                |||
Sbjct 1930112 GCTATCATCGATAAAGAACATACAGCTGATAAATGGCGACCAATTGATTTTCAAATGAAA 1930053

Query 943      AATGATAAAGGTGAAAGACAGTTCATCATTATGCTAGTACTGTTGAACCAGCAACTGTC 1002
                |||
Sbjct 1930052 AATGATAAAGGTGAAAGACAGTTCATCATTATGCTAGTACTGTTGAACCAGCAACTGTC 1929993

Query 1003     ATTTTACAAAACAGGACCAATAATTGAATTAGGTTTAAAGACAGCTTCAACATGGAAG 1062
                |||
Sbjct 1929992 ATTTTACAAAACAGGACCAATAATTGAATTAGGTTTAAAGACAGCTTCAACATGGAAG 1929933

Query 1063     AAATTTGAAGTTTATGAAGGTGACAAAAGTTACCAGTCGAATTAGTATCATATGATTCT 1122
                |||
Sbjct 1929932 AAATTTGAAGTTTATGAAGGTGACAAAAGTTACCAGTCGAATTAGTATCATATGATTCT 1929873

Query 1123     GATAAAGATTATGCCTATATTCGTTTCCCAGTATCTAATGGTACGAGAGAAGTTAAAAAT 1182
                |||
Sbjct 1929872 GATAAAGATTATGCCTATATTCGTTTCCCAGTATCTAATGGTACGAGAGAAGTTAAAAAT 1929813

Query 1183     GTGTCATCTATTGAATATGGTGAAGAACATCCATGAAGACTATGATTATACGCTAATGGTC 1242
                |||
Sbjct 1929812 GTGTCATCTATTGAATATGGTGAAGAACATCCATGAAGACTATGATTATACGCTAATGGTC 1929753

Query 1243     ITTGCACAGCCTATTACTAATAACCCAGACGACTATGTGGATGAA 1287
                |||
Sbjct 1929752 ITTGCACAGCCTATTACTAATAACCCAGACGACTATGTGGATGAA 1929708
    
```

Figura 50. Ejemplo del alineamiento de la secuencia de *IsdHd1-2* clonada en pGEM T-easy, empleando el programa BLAST®. En amarillo se resaltan la descripción de la secuencia con la que alinea y el porcentaje de identidad.

AI-8.SECUENCIA CORRESPONDIENTE A Atox.

AI-8-1.Secuencia a amplificar por PCR

Para el armado de los cebadores se usó la secuencia con número de acceso: BX571857.1. La secuencia resaltada en amarillo corresponde al fragmento de Atox, en verde se señalan los sitios hibridación de los oligonucleótidos usados en la PCR [Tabla 5], y en rojo se muestra el codón de inicio de la traducción. El tamaño esperado del fragmento a obtener es de 850 pb.

```
Atgaaaaacagctatagtcagctcagtaacaacaacactattgctaggttccatattaatgaatcctgtcgctaatagcccagattc
tgatattaatattaaaac aagcaatactacagtaaaaaacaggtgatttagtcacttatgataaaagaaa
atggcatgcacaaaaaagtattttatagttttatcgatgataaaaaatcacaataaaaaactgctagttattagaacgaaaggtacc
attgctggtcaatatagagttttatagcgaagaaggtgctaacaaaagtggtttagcctggccttcagcctttaaggtacagttgca
actacctgataatgaagtagctcaaatatctgattactatccaagaaattcgattgatacaaaaagagtatatgagttactttaactt
atggattcaacggttaagtactggtgatgatacaggaaaaattggcggccttattggtgcaaatgtttcgattggtcatacactg
aaatatgttcaacctgattttcaaaaacaatttttagagagcccaactgataaaaaagtaggctggaaagtgatatttaacaatatggt
gaatcaaaattggggaccatgatgagagattcttggaaaccgggtatatggcaatcaacttttcatgaaaactagaaatggttcta
tgaaagcagcagataaacttccttgatcctaacaagaaggttctctattatcttcagggttttcaccagacttcgctacagttatt
actatggatagaaaagcatccaacaacaacaacaatatagatgtaataatacgaacgagttcgtgatgattaccaattgcattggac
ttcaacaatttgaaaggtaccaataactaaagataaatggacagatcgttcttcagaaagatataaaatcgattg
aattaa
```

AI-8-2.Análisis de la secuencia clonada en el vector pGEM T-easy.

El resultado de la secuenciación del fragmento correspondiente a Atox fue el siguiente:

```
ACCCCATGCATCCACGCGTTGGGGAGCTCTCCATATGGTGCACCTGCAGGCGGCCGGAATTCAGTAGTGATTGAATCCGGTACT
ACAGATATTGGAAGCAATACTACAGTAAAAACAGGTGATTTAGTCACCTTATGATAAAGAAAAATGGCATGCACAAAAAGTATTTTA
TAGTTTTATCGATGATAAAAAATCACAATAAAAAACTGCTAGTTATTAGAACGAAAGGTACCATTGCTGGTCAATATAGAGTTTATA
GCGAAGAAGGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTAAGGTACAGTTGCAACTACCTGATAATGAAGTAGCTCAA
ATATCTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTGATACAAAAGAGTATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGG
TGATGATACAGGAAAAATTGGCGCCTTATTGGTGCAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATGTTCAACCTGATTTCAAAA
CAATTTAGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATTTAACAATATGGTGAATCAAAATGGGGACCATATGAT
AGAGATTCTTGGAAACCGGTATATGGCAATCAACTTTTCATGAAAACAGAAATGGTACTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTTGA
TCCTAACAAAGCAAGTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCACCAGATTTTCGCTACAGTTATTACTATGGATAGAAAAGCATCCAAAC
AACAAACAATATAGATGTAATATACGAACGAGTTCGTGATGATTACCAATTGCAATTGGACTTCAACAAATGGAAAGGTACCAAT
ACTAAAGATAAATGGACAGATCGTTCTTCAGAAAGATATAAAATCGATTGGGAAAAAGAAAGAAATGACAGAGCTCAATCGAATTC
CGCGGCCGCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTT
TTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAG
CGAAAAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCCACCCGTAATGGCGAATGGGACGCCCCCTGTAACGGCGCATAAAACC
GGCGGGGGTTGTGGGTTTCCCCACCGTGACCGCTAACTTTGCAGGGCCCTAAGGCCCGGTCTTTTCGTTTTTTCCCTCCTTTTTTC
CCCCATTTGCCGGGTTTCCCGTCAAACTAAATAAGGGGGCCTCTCTAGGGGGCGATTTTATGGTTTTTGGCCCTCCCCCAAACAAT
AATTTTAGGGAGGGGTGGCCTGTAGGGCGCCCCCTAAACAGGTTTCGCTCTTCCCTGGAGGGCAGCCTCTCTTAAGAACTATG
TTCAATGAGGACCCAAACAACCTTCGCTTTTCTTTTAAATAGAGGATGAACTGCGCGCGGGTAAAAAAGGAA
```

Resaltado en amarillo se visualiza la secuencia de interés, y por fuera de dicha región se muestra la secuencia del vector de clonado. El resultado de la secuenciación se comparó con las secuencias

indexadas en el GeneBank, empleando la herramienta BLAST®. En la figura 51 se muestra como ejemplo, uno de los alineamientos obtenidos. No se encontraron mutaciones en el fragmento obtenido, y alineó específicamente con secuencias identificadas como alfa-hemolisina.

Staphylococcus aureus subsp. aureus COL alpha-hemolysin (hla) gene, partial cds
 Sequence ID: [gb|KM019635.1](#) Length: 564 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 563 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|----------------|---|---------------|-----------|-----------|
| 1018 bits(551) | 0.0 | 559/563 (99%) | 0/563(0%) | Plus/Plus |
| Query 1 | GGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTAAGGTACAGTTGCAACTACCT | 60 | | |
| Sbjct 1 | GGTGCTAACAAAAGTGGTTTAGCCTGGCCTTCAGCCTTTAAGGTACAGTTGCAACTACCT | 60 | | |
| Query 61 | GATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTGATACAAAAGAG | 120 | | |
| Sbjct 61 | GATAATGAAGTAGCTCAAATATCTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTGATACAAAAGAG | 120 | | |
| Query 121 | TATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGATGATACAGGAAAA | 180 | | |
| Sbjct 121 | TATATGAGTACTTTAACTTATGGATTCAACGGTAATGTTACTGGTGATGATACAGGAAAA | 180 | | |
| Query 181 | ATTGGCGGCCTTATTGGTGCAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATGTTCAACCT | 240 | | |
| Sbjct 181 | ATTGGCGGCCTTATTGGTGCAAATGTTTCGATTGGTCATACACTGAAATATGTTCAACCT | 240 | | |
| Query 241 | GATTICAAAACAATTTTAGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTT | 300 | | |
| Sbjct 241 | GATTICAAAACAATTTTAGAGAGCCCAACTGATAAAAAAGTAGGCTGGAAAGTGATATTT | 300 | | |
| Query 301 | AACAATATGGTGAATCAAATGGGGACCAATGATAGAGATTCTTGGAAACCCGGTATAT | 360 | | |
| Sbjct 301 | AACAATATGGTGAATCAAATGGGGACCAATGATAGAGATTCTTGGAAACCCGGTATAT | 360 | | |
| Query 361 | GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAATGGTACTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTT | 420 | | |
| Sbjct 361 | GGCAATCAACTTTTCATGAAAAGTAGAAATGGTACTATGAAAGCAGCAGATAACTTCCTT | 420 | | |
| Query 421 | GATCCTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACCAGATTTCGCTACAGTT | 480 | | |
| Sbjct 421 | GATCCTAACAAAGCAAGTTCTCTATTATCTTCAGGGTTTTCCACCAGATTTCGCTACAGTT | 480 | | |
| Query 481 | ATTACTATGGATAGAAAAGCATCCAAACAACAACAAATATAGATGTAATATACGAACGA | 540 | | |
| Sbjct 481 | ATTACTATGGATAGAAAAGCATCCAAACAACAACAAATATAGATGTAATATACGAACGA | 540 | | |
| Query 541 | GTTTCGTGATGATTACCAATTGCA 563 | | | |
| Sbjct 541 | GTTTCGTGATGATTACCAATTGCA 563 | | | |

Figura 51. Ejemplo del alineamiento de la secuencia de Atox clonada en pGEM T-easy, empleando el programa BLAST®. En amarillo se resaltan la descripción de la secuencia con la que alinea y el porcentaje de identidad.

Apéndice II:

Soluciones y medios

Medios de cultivo

| | | |
|-----------------------|----------------------|-------------|
| - Luria Bertani (LB): | Peptona de carne | 1 % (p/v) |
| | Extracto de Levadura | 0,5 % (p/v) |
| | NaCl | 0,5 % (p/v) |
| | pH | 7,3 |
| - LB agar | Medio LB | |
| | Agar agar | 2 % (p/v) |
| - Agar sangre | Peptona de carne | 0,5 % (p/v) |
| | Tripteína | 1 % (p/v) |
| | Extracto de levadura | 0,5 % (p/v) |
| | Extracto de corazón | 0,3 % (p/v) |
| | Almidón | 0,1 % (p/v) |
| | NaCl | 0,5 % (p/v) |
| | Sangre bovina | 5 % |
| | Agar agar | 1,5 % (p/v) |

Soluciones amortiguadoras

| | | |
|------------------------|----------------------------------|---------|
| -PBS | NaCl | 137 mM |
| | KCl | 2,7 M |
| | Na ₂ HPO ₄ | 10 M |
| | K ₂ HPO ₄ | 1,8 mM |
| | pH | 7,4 |
| -PBS-Tween | PBS | |
| | Tween 20 | 0,05 % |
| -Solución de Carbonato | NaHCO ₃ | 0,035 M |
| | Na ₂ CO ₃ | 0,015 M |
| | pH | 9,6 |
| -Solución MOPS | MOPS | |
| | EDTA | 20 mM |
| | B-mercaptoetanol | 1 mM |

Electroforesis en geles de agarosa

| | | |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| -Solución de siembra 6X | Azul de Bromofenol Glicerol | 0,25 % (p/v) 30 % (v/v) |
| - Solución de corrida (TAE) | Tris- acetato, pH= 8 EDTA | 40 Mm 1 mM |

Transformación de bacterias *E. coli* por la técnica clásica

| | | |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| - Solución de transformación 1 (ST1) | Buffer Mops, KCl pH | 10 mM 10 mM 7 |
| -Solución de transformación 2 (ST2) | Buffer Mops KCl CaCl ₂ pH | 100 mM 10 mM 50 mM 6,5 |

SDS-PAGE

| | | |
|-----------------------|---|---|
| -Gel de separación | Tris – HCl, pH 8,8 SDS Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) Glicerol TEMED Persulfato de amonio | 375 mM SDS 0.1 % (p/v) 15 % (p/v) 10 % (v/v) 0.06 % (v/v) 0.05 % (p/v) |
| -Gel de apilamiento | Tris-HCl pH 6,8 SDS Acrilamida/Bisacrilamida (29:1) TEMED Persulfato de amonio | 130 mM 0,05 % (p/v) 4.8 % (p/v) 0.1 % (v/v) 0.05 % (p/v) |
| -Buffer de siembra 2x | Tris-HCl pH= 8,8 Glicerol SDS β -mercaptoetanol Azul de bromofenol | 125 mM 20 % (v/v) 4 % (p/v) 5 % (v/v) 0,2 % (p/v) |

| | | |
|--------------------|--------------------|-------------|
| -Buffer de corrida | Tris – HCl, pH 8,3 | 25 mM |
| | Glicina | 192 mM |
| | SDS | 0.1 % (p/v) |

Tinción con Coomasie

| | | |
|--------------------------|------------------------|-------------|
| -Solución colorante | Azul de Coomasie G-250 | 0,5 % (p/v) |
| | Etanol | 45 % (v/v) |
| | Ácido acético | 10 % (v/v) |
| -Solución decolorante I | Etanol | 50 % (v/v) |
| | Ácido acético | 10 % (v/v) |
| -Solución decolorante II | Etanol | 10 % |
| | Ácido acético | 7 % |

Tinción con Plata

| | | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------|
| -Solución de fijación | Etanol | 30 % (v/v) |
| | Ácido acético | 10 % (v/v) |
| - Solución de sensibilización | Tiosulfato de sodio | 0,8 mM |
| -Solución de Plata | AgNO ₃ | 12 mM |
| -Solución de revelado | Na ₂ CO ₃ | 3 % (p/v) |
| | Formalina | 0,25 % (v/v) |
| | Tiosulfato de Sodio 10% | 0,125 % (v/v) |
| -Solución de frenado | Tris | 4 % (p/v) |
| | Ácido acético | 2 % (v/v) |

Western Blot

| | | |
|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| -Solución de Transferencia | Tris - HCl pH 8,3 | 25 mM |
| | Glicina | 192 mM |
| | Etanol | 20% (v/v) |
| -Solución de revelado | PBS | |
| | DMSO | 1,5 % (v/v) |
| | H ₂ O ₂ | 0,1 % (v/v) |
| | Diaminobezidina | 0,05 % (p/v) |

Cromatografía de pseudoafinidad a Níquel

| | | |
|-------------------------------|----------------------------------|--------|
| -Solución madre (SM) | Na ₂ HPO ₄ | 20 mM |
| | NaH ₂ PO ₄ | 20 mM |
| | NaCl | 0,5 M |
| | pH | 7,4 |
| -Solución de siembra (SS) | SM | |
| | Imidazol | 20 mM |
| | pH | 7,4 |
| -Solución de elución 1 (SE1) | SM | |
| | Imidazol | 50 mM |
| | pH | 7,4 |
| - Solución de elución 2 (SE2) | SM | |
| | Imidazol | 100 mM |
| | pH | 7,4 |
| -Solución de elución 3 (SE3) | SM | |
| | Imidazol | 250 mM |
| | pH | 7,4 |
| -Solución de elución 4 (SE4) | SM | |
| | Imidazol | 500 Mm |
| | pH | 7,4 |

Purificación en condiciones Desnaturalizantes con Replegamiento de la proteína *in situ* (pdr)

| | | |
|---|------------------|-------|
| -Solución de pegado desnaturalizante (SSD) | Tris-HCl | 20 mM |
| | NaCl | 0,5 M |
| | B-mercaptoetanol | 1 mM |
| | Imidazol | 20 mM |
| | Urea | 4 M |
| | pH | 8 |
| -Solución madre de replegamiento (SMR) | Tris-HCl | 20 mM |
| | NaCl | 0,5 M |
| | B-mercaptoetanol | 1 mM |
| | Imidazol | 20 mM |
| | pH | 8 |
| -Solución de replegamiento 1 (SR1) | SMR | |
| | Urea | 3M |

| | | |
|------------------------------------|---|-----------------------------|
| -Solución de replegamiento 2 (SR2) | SMR Urea | 2 M |
| -Solución de replegamiento 3 (SR3) | SMR Urea | 1 M |
| -Solución de replegamiento 4 (SR4) | SMR Urea | 0,5 M |
| -Solución madre de elución (SMEdr) | Tris-HCl NaCl β -mercaptoetanol pH | 20 mM 0,5 M 1 mM 8 |
| -Solución de elución 1 (SEdr1) | SM Imidazol pH | 50 mM 8 |
| -Solución de elución 2 (SEdr2) | SM Imidazol pH | 100 mM 8 |
| -Solución de elución 3 (SEdr3) | SM Imidazol pH | 250 mM 8 |
| -Solución de elución 4 (SEdr4) | SM Imidazol pH | 500 mM 8 |

Tratamiento enzimático con Enteroquinasa

| | | |
|------------------------------|---|------------------------|
| -Solución para Enteroquinasa | Tris-HCl (pH= 7,4) NaCl CaCl ₂ | 20 mM 50 mM 2 mM |
|------------------------------|---|------------------------|

Ensayo de opsonofagocitosis

| | | |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| - FITC/NaCO ₃ | FITC NaCO ₃ pH | 0,1 mg/ml 0,1 M 9 |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|

| | | |
|---------------------------|------------------------|--------------|
| - Solución de fagocitosis | RPMI 1640 (Sigma) | |
| | Mg(SO) ₄ | 0,6 mM |
| | CaCl ₂ | 2 mM |
| | Albumina sérica bovina | 0,1 % (p/v) |
| | pH | 7,2 |
| - Solución de lisis | NH ₄ Cl | 150 mM |
| | KHCO ₃ | 1 mM |
| | EDTA | 0,1 mM |
| | pH | 7,2 |
| - Azul de Tripan | PBS | |
| | Azul de Tripan | 0,4 % (p/v) |
| - Solución de frenado | NaCl | 0,85% |
| | EDTA | 0,04% |
| | pH | 7,2 |
| - PBS-BrEt | PBS | |
| | Bromuro de Etidio | 5 mg/ml |
| Solución de citometría | PBS | |
| | EDTA | 0,5 mM |
| | Azida sódica | 0,01 % (p/v) |
| | Albúmina sérica bovina | 1 % (p/v) |
| | pH | 7,2 |

Actividad hemolítica

| | | |
|---------------------------|------------------------|------|
| -Solución diluyente de GR | PBS | |
| | Mg(SO) ₄ | 2 mM |
| | Albumina sérica bovina | 0,1% |

Ensayos de internalización

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

Apéndice III:

Publicaciones científicas realizadas