

cytokines and receptor expression in PBMC in response to specific stimulation with conserved viral sequences contained in gp90 and gp45 peptides. The results showed differences between the asymptomatic horses selected, with responses that ranged from those similar to responses obtained in EIAV(-) equines, through responses with a shared Th1/Th2 cytokine profile, to respon-

ses with a clear Th1 profile, with high levels of IL-12 and IFN- γ . These results demonstrate the complexity of the study of lentiviral infections in outbred animal species and are also in agreement with research on other retroviral infections in terms of cytokine profiles, the relationship of cytokine profiles with disease progression and variability between individuals.

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

Camussone Cecilia María

camussone.cecilia@inta.gob.ar

Luis Fernando Calvinho, PhD

Dr. Iván Marcipar

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. INTA. Ruta 34, Km 227. (2300) Rafaela, Santa Fe. Argentina.

Área de Investigación en Producción Animal
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 25/03/13

Resumen

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que causa las mayores pérdidas económicas al productor y a la industria lechera. Si bien puede ser causada por varios agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis en Argentina y en otros países de gran desarrollo lechero. *S. aureus* posee la habilidad de invadir tejidos y sobrevivir intracelularmente, lo cual lo protegería de la respuesta inmune humoral del hospedador y el tratamiento con antibióticos. Estas particulares características

determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales, tendiendo a producir infecciones intramamarias (IIM) crónicas, que pueden ocasionar daños permanentes al tejido mamario. Por consiguiente, se han propuesto medidas alternativas que permitan una mayor reducción de la prevalencia de mastitis, tendiendo a un menor uso de antimicrobianos. Una de ellas es la manipulación de los mecanismos de defensa específicos del hospedador a través del uso de inmunógenos. En las últimas décadas se han desarrollado diversas vacunas experimentales. Algunas de ellas, compuestas por bacterinas o lisados de cultivos de *S. aureus*, alcanzaron la fase de comercialización. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento con estos inmunógenos muestran un control parcial de la infección. Estas observaciones señalan la necesidad de explorar nuevas alternativas para mejorar el desempeño de las bacterinas actualmente disponibles. Se ha propuesto que, para una protección adecuada, la vía de administración del inmunógeno, así como el adyuvante

utilizado en la formulación deberían inducir la producción de anticuerpos opsonicos y la estimulación de una respuesta inmune celular con activación de células fagocíticas. El adyuvante clásico utilizado internamente en vacunas veterinarias es el $Al(OH)_3$. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas adyuvantes, entre ellos, los complejos inmunoestimulantes como Iscom Matrix. Los mismos están compuestos por saponinas, colesterol y fosfolípidos, y se han mostrado capaces de inducir respuestas humorales/celulares balanceadas. Si bien hay numerosos antecedentes del uso de estos complejos en la formulación de vacunas veterinarias, las mismas están en su mayoría compuestas por antígenos definidos, y no existe experiencia en su aplicación para la formulación de bacterias enteras o lisadas.

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un prototipo de vacuna contra IIM bovinas causadas por *Staphylococcus aureus*. Para alcanzarlo, en una primera etapa se compararon las respuestas inmunes generadas en bovinos por bacterinas de *S. aureus* productoras de polisacárido capsular 5 (CP5), formuladas con un adyuvante tradicional, $Al(OH)_3$, o un adyuvante de nueva generación, Iscom Matrix. Se inmunizaron vaquillonas preñadas con 2 dosis de los inmunógenos, y se evaluó la respuesta inmune humoral específica y la funcionalidad de los anticuerpos generados. La formulación del inmunógeno experimental con Iscom Matrix potenció la respuesta inmune humoral a través de la producción de IgG específica en sangre y leche y un significativo incremento de los niveles de IgG_2 sanguíneos, lo cual se asoció con una mayor capacidad opsonica de los sueros. Sobre la base de estos resultados se seleccionó

a Iscom Matrix como adyuvante para la formulación de los siguientes inmunógenos a evaluar en este trabajo. Posteriormente, se compararon las respuestas inmunes generadas en vaquillonas preñadas por una bacterina y un lisado de *S. aureus* CP5 formulados con Iscom Matrix. Luego de la aplicación de 2 dosis de los inmunógenos, se observaron en ambos grupos inmunizados potentes respuestas humorales específicas en sangre y leche, con anticuerpos capaces de favorecer la fagocitosis del microorganismo por neutrófilos bovinos e inhibir su internalización en células epiteliales mamarias. Entre ellos, la formulación con lisado bacteriano mostró un mejor desempeño en cuanto a la producción de anticuerpos específicos e inducción temprana de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y regulatorias. Sin embargo, no se observó la producción de anticuerpos dirigidos hacia antígenos superficiales de *S. aureus*, como la proteína de unión a fibronectina A (FnBP-A) y el *Clumping factor A* (ClfA) o tóxicos, como la β -toxina, en ninguno de los animales inmunizados. Frente a estos resultados, se obtuvieron, por medio de tecnología de ADN recombinante, los antígenos β -toxina, FnBP-A y ClfA, cuyo rol en la patogenicidad de *S. aureus* y acción en diferentes etapas de la IIM han sido demostrados. En una última etapa del trabajo, las moléculas recombinantes se utilizaron para complementar una formulación basada en células lisadas de *S. aureus* CP5 y formulada con Iscom Matrix. La inmunización de vaquillonas con 2 dosis de este inmunógeno potenció la respuesta de anticuerpos en sangre y leche dirigidos hacia los antígenos recombinantes. Los mismos resultaron eficientes en la opsonización del microorganismo y en la neutralización de la actividad de la β -toxina

nativa de *S. aureus in vitro*, posicionando a estos componentes como buenos candidatos para ser incorporados en una formulación destinada a la inmunoprofilaxis de las IIM bovinas causadas por *S. aureus*.

Development of a prototypic immunogen for the control of Staphylococcus aureus bovine mastitis

Summary

Staphylococcus aureus is the most frequently isolated pathogen from bovine mastitis in Argentina and worldwide. The peculiar pathogenic characteristics of *S. aureus* lead to the development of alternatives measures, like immunization, to control this disease. The aim of this study was to develop a prototype vaccine against *S. aureus* bovine mastitis.

Immune responses induced in heifers by *S. aureus* bacterins from a capsular polysaccharide 5 (CP5) producing strain, formulated either with Al(OH)₃ or Iscom Matrix, were compared. Formulation of experimental immunogen with Iscom Matrix strengthe-

ned specific humoral immune response in blood and milk, with an augmented opsonic capacity. Later, immune responses generated in heifers by either a *S. aureus* CP5 bacterin or lysate, formulated with Iscom Matrix were evaluated. The bacterial lysate formulation showed a better performance regarding production of specific and functional antibodies and induction of cytokines involved in early immune responses to the immunogen. Finally, a prototype immunogen composed by *S. aureus* CP5 lysate, supplemented with recombinant molecules of superficial *S. aureus* antigens, like fibronectin binding protein A (FnBP-A) and clumping factor A (ClfA), or toxic components, like β -toxin, adjuvanted with Iscom Matrix, was obtained. Heifers' immunization with the multicomponent immunogen strengthened antibody responses against recombinant antigens in blood and milk. These antibodies were efficient in opsonizing *S. aureus* and blocking native β -toxin hemolytic activity *in vitro*, placing these antigens as good candidates to be included in a formulation directed to prevent staphylococcal bovine mastitis.

Aprovechamiento integral del alga *Phorphyra Columbina*. Procesos de extracción de ficocomponentes (proteínas y polisacáridos). Estudio de sus propiedades bio y tecno-funcionales

Cian Raúl Esteban

cianraul@conicet.gov.ar

Ing. Rolando J. González

Dra. Silvina R. Drago

Área Cereales y Oleaginosas –

Instituto de Tecnología de Alimentos

Facultad de Ingeniería Química

Universidad Nacional del Litoral

Fecha de defensa: 02/10/2013

Resumen

El objetivo general de la presente tesis fue obtener extractos de *fico-componentes* (proteínas y polisacáridos) a partir del