

RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA UNA BACTERINA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CP5 EN VAQUILLONAS EMPLEANDO DOS VÍAS DE INOCULACIÓN

CAMUSSONE, C.^{1,2}; SIGNORINI, M.^{1,2}; GALARZA, R.²; REJF, P.⁴;
MARCIPAR, I.³ & CALVINHO, L.F.^{2,4}

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de IIM crónicas en Argentina. Este organismo produce polisacáridos capsulares (CP), y los anticuerpos dirigidos contra ellos favorecen la opsonofagocitosis. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral hacia una bacterina compuesta por una cepa de referencia *S. aureus* CP5 (Reynolds) formulada con Hidróxido de Aluminio [Al(OH)₃], y comparar la respuesta obtenida al utilizar dos vías diferentes de inoculación. Se utilizaron 18 vaquillonas Holstein preñadas. Un grupo de ellas recibió la formulación por vía subcutánea en el área del ganglio linfático supramamario, otro en la tabla del cuello y el tercero actuó como control. Se evaluó la presencia de IgG específica en suero de sangre y leche mediante la técnica de ELISA. Los animales vacunados presentaron niveles de anticuerpos significativamente mayores al de los no vacunados, siendo la vía supramamaria la que estimuló una mayor producción de IgG en sangre. Los niveles de IgG en leche fueron superiores en los animales vacunados respecto de los controles, aunque no se detectaron diferencias asociadas con la vía de inoculación.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, bacterina, polisacáridos capsulares, área supramamaria

SUMMARY

Humoral immune response against a *Staphylococcus aureus* CP 5 bacterin using two inoculation routes.

Staphylococcus aureus is the most frequently isolated pathogen from bovine chronic intramammary infections in Argentina. This organism produces capsular polysaccharides (CP) and antibodies directed against these components favour opsonophagocytosis. The aim of this study was to evaluate the humoral immune response against a *S. aureus* bacterin of a reference strain CP5 type (Reynolds) using two different inoculation routes. Eighteen Holstein pregnant heifers were used. One group was vaccinated subcutaneously in the supramammary lymph node area (SLNA), a second group

1.- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

2.- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Rafaela. Ruta 34 km 227. Rafaela. Santa Fe.

3.- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). Paraje El Pozo, Santa Fe.

4.- Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL). Kreder 2805, Esperanza. Santa Fe. Email:

lcalvinho@rafaela.inta.gov.ar

Trabajo financiado con fondos del Proyecto Nacional INTA N° PNLEC 1601 y Asociación Cooperadora de INTA Rafaela.

subcutaneously in the neck and a third group was a non vaccinated control. Levels of total IgG were assessed in blood sera and whey by an ELISA technique. Vaccinated animals showed significantly higher IgG levels than non vaccinated controls. In addition, heifers vaccinated through the SLNA route showed the highest IgG levels in blood sera; while IgG levels in whey were higher in vaccinates than controls, although differences between inoculation routes were not detected.

Key words: *Staphylococcus aureus*, bacterin, capsular polysaccharides, supramammary area.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es el organismo más frecuentemente aislado de casos de mastitis en Argentina (Calvinho y Tirante, 2005), así como en otros países (Zecconi *et al.*, 2006), causando infecciones intramamarias (IIM) de naturaleza crónica, que generan un extenso daño al tejido mamario y son refractarias a la terapia antibiótica (Zecconi *et al.*, 2006). Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas "no antibióticas" para coadyuvar al control de esta enfermedad. La vacunación es una de estas alternativas y hasta el presente se dispone en algunos países de bacterinas que han mostrado cierta eficacia para reducir el número de IIM y disminuir pérdidas en producción de leche (Giraud *et al.*, 1997; Middleton *et al.*, 2009). Las cepas utilizadas en las bacterinas son seleccionadas sobre la base de la presencia de antígenos considerados relevantes para conferir protección contra esta enfermedad. *S. aureus* produce polisacáridos capsulares (CP) que le confieren propiedades antifagocíticas *in vitro* y se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra ellos favorecen la opsonofagocitosis (Guidry *et al.*, 1994; Cunnion *et al.*, 2003). Consecuentemente, algunas bacterinas disponibles comercialmente en otros países han sido seleccionadas sobre la base de sus tipos de CP (Ma *et al.*, 2004). En un estudio reciente en el que se evaluó la prevalencia de CP5 y CP8 en 144

aislados de *S. aureus* de las provincias de Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires, se encontró que el 52,78% de las cepas poseía el locus capsular cap5 (Camussone *et al.*, 2008), lo cual respalda la inclusión de cepas de *S. aureus* que expresen ese tipo capsular en vacunas dirigidas al control de IIM causadas por este organismo.

Para lograr una respuesta inmune humoral óptima, se han utilizado diferentes adyuvantes, vías y regímenes de inoculación. Entre las distintas vías, se ha utilizado la intramamaria (Brock *et al.*, 1975; Nonnecke *et al.*, 1986; Fitzpatrick *et al.*, 1992); intramuscular (Brock *et al.*, 1975; Schultze & Paape, 1984), subcutánea en la región de los ganglios supramamarios (Nickerson *et al.*, 1993; Tollersrud *et al.*, 2001) u otras áreas anatómicas como el músculo braquiocefálico (Giraud *et al.*, 1997; Luby *et al.*, 2007). Asimismo, se han utilizado distintos adyuvantes, como el completo de Freund (Brock *et al.*, 1975), incompleto de Freund (Nickerson *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2005), sulfato de dextran (Guidry *et al.*, 1994), adyuvantes oleosos como Montanide ISA70 (Tollersrud *et al.*, 2001), e hidróxido de aluminio (Lee *et al.*, 2005), obteniéndose distintas respuestas humorales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta inmune humoral a una bacterina formulada con una cepa de referencia de *S. aureus* tipo antigénico capsular 5 utilizando dos vías distintas de inoculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vacuna experimental

Se utilizó la cepa de referencia *S. aureus* Reynolds que posee tipo antigénico capsular CP5. El microorganismo se mantuvo congelado a -80°C en infusión cerebro corazón adicionado con 15% de glicerol. La cepa fue reactivada mediante cultivo en infusión cerebro corazón a 37°C por 18 hs. Una alícuota de 100 μl del cultivo se sembró en agar tripticosa soya suplementado con 2,5% de NaCl y se incubó a 37°C durante 18 hs. El cultivo fue lavado dos veces con PBS (pH 7,4) mediante centrifugaciones de 15 minutos a 4000rpm, resuspendido para lograr una concentración final de 1×10^9 ufc/ml e inactivado con formol al 0,5% a 37°C por 24 hs. La bacterina fue formulada con 15% de $\text{Al}(\text{OH})_3$ estéril (Alhydrogel). La esterilidad de la formulación se evaluó sembrando 100 μl de la misma por duplicado en placas de agar Columbia adicionado con 5% de sangre de ternero.

Animales experimentales y diseño experimental

Se utilizaron 18 vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación del rodeo de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA. Las mismas se dividieron al azar en 3 grupos. Uno de ellos recibió 1 ml de la formulación de forma subcutánea en el área del linfonodo supramamario (G1), otro en la tabla del cuello (G2) y el tercero actuó como control sin inocular (G3). Las vaquillonas fueron vacunadas 45 y 15 días antes de la fecha probable de parto. El día 15 pre-parto todas las ubres de los animales incluidos en el ensayo fueron examinadas clínicamente por palpación y se tomaron muestras de secreción mamaria pre-parto para análisis bacteriológico. Las muestras fueron recolectadas en forma aséptica si-

guiendo procedimientos estándar (Hogan *et al.*, 1999) y luego del muestreo los pezones de las vaquillonas fueron sumergidos en una solución antiséptica conteniendo 0,5% de yodo disponible. Los grupos iniciales incluyeron 6 vaquillonas en cada uno, considerando la posibilidad de la eliminación de hasta dos animales por grupo debido a la presencia de cuartos mamarios con anomalías durante la exploración clínica. Las vaquillonas fueron mantenidas en condiciones de pastoreo durante la prueba. Sólo se incluyeron en el ensayo a vaquillonas libres de IIM por *S. aureus*.

Frecuencia de muestreos y tipo de muestras

Los animales fueron sangrados por punción coccígea para obtener el suero sanguíneo. Los tipos de muestra tomados y la frecuencia de muestreo se detallan en el Cuadro 1. Las muestras de suero fueron conservadas a -20°C por un período no mayor a un mes antes de su procesamiento.

Cultivos bacteriológicos

Las muestras de leche fueron sembradas en agar Columbia adicionado con 5% de sangre de ternero y cultivadas según procedimientos estándar (Hogan *et al.*, 1999). Se sembraron 10 μl de secreción mamaria perteneciente a un cuarto mamario en un cuadrante de placa de cultivo. La presencia de una sola colonia de *S. aureus* (límite de detección 100 ufc/mL) fue considerado como un cultivo positivo.

Métodos serológicos

Los anticuerpos generados contra la bacterina fueron evaluados por un test de ELISA. Las placas de 96 pocillos (Flat bottom, Greiner Bio-One) fueron cubiertas durante 1 h a 37°C con una suspensión de la bacterina en PBS (pH 7,2) conteniendo $1\mu\text{g/pocillo}$.

Cuadro 1: Esquema de vacunación, tipos de muestras y frecuencia de muestreo.

Número	Días relativos al parto	Tipo de muestra	Observaciones
1	-45	Suero	Antes de la 1 ^{era} dosis
2	-30	Suero	
3	-14	Suero/secreción pre-calostroal	Antes de la 2 ^{da} dosis
4	0	Suero/calostro	Luego del parto
5	+7	Suero	
6	+14	Suero/leche	

Entre cada paso, las placas fueron lavadas 3 veces con Tween 20 al 0,05% en PBS. Las placas cubiertas fueron incubadas por 1 h a 37°C con PBS adicionado con leche en polvo caprina descremada al 5% libre de anticuerpos contra *S. aureus* CP5. El suero sanguíneo y la leche de las vaquillonas fueron diluidos en PBS-leche caprina al 1% 1:200 y 1:20, respectivamente, distribuido por duplicado e incubado por 1 h a 37°C, seguido por un segundo anticuerpo de cabra anti IgG (H+L) (Sigma) conjugado con peroxidasa. Luego de la incubación se adicionó sustrato para la enzima peroxidasa. La reacción fue detenida luego de 10 minutos a temperatura de laboratorio mediante la adición de 0,5N H₂SO₄. La densidad óptica (DO) fue leída a 450 nm en lector de ELISA (Infinite F50, Tecan).

Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño con datos recogidos en una secuencia de puntos espaciados en el tiempo en forma desigual para el análisis comparativo de las respuestas de anticuer-

pos, medidas como DO, de los diferentes grupos de tratamiento a través del tiempo, empleándose un modelo factorial para los factores tratamiento (control, inoculación tabla del cuello e inoculación área supramamaria) y tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5 días). Las medias de DO obtenidas en el test de ELISA para IgG de los diferentes grupos de tratamiento, fueron comparadas en cada estación de muestreo por medio de análisis de la varianza para muestras repetidas (ANOVA), seguido por el test de Duncan en caso de obtener diferencias significativas ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Durante el transcurso del ensayo no se detectaron IIM por *S. aureus* en las vaquillonas de los distintos grupos. En las figuras 1 y 2 se puede observar el promedio de los títulos de IgG total específicos obtenidos en suero de sangre y leche respectiva-

mente, para cada grupo evaluado.

Se observó que en ambos casos los animales vacunados presentaron niveles de anticuerpos significativamente mayores al de los no vacunados ($p < 0,05$). Los niveles de IgG total en sangre mostraron una declinación mayor en el grupo vacunado en la

tabla del cuello antes de recibir la dosis de refuerzo (día -14). En este día las diferencias entre los niveles obtenidos para los tres grupos fueron significativas ($p < 0,05$), obteniéndose el mayor título en el grupo vacunado en el área supramamaria. A partir del día -14, al recibir la dosis refuerzo, y hasta el día +7, las

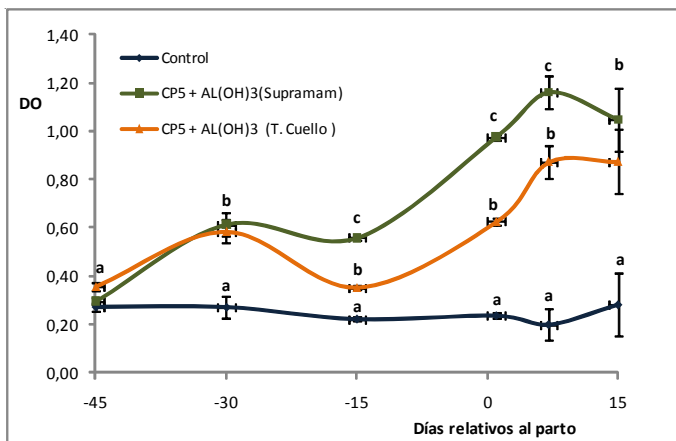


Figura 1: Niveles promedio de IgG total en suero de vaquillonas inmunizadas por dos vías de inoculación distintas con una bacterina tipo capsular 5 de *Staphylococcus aureus*. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas.

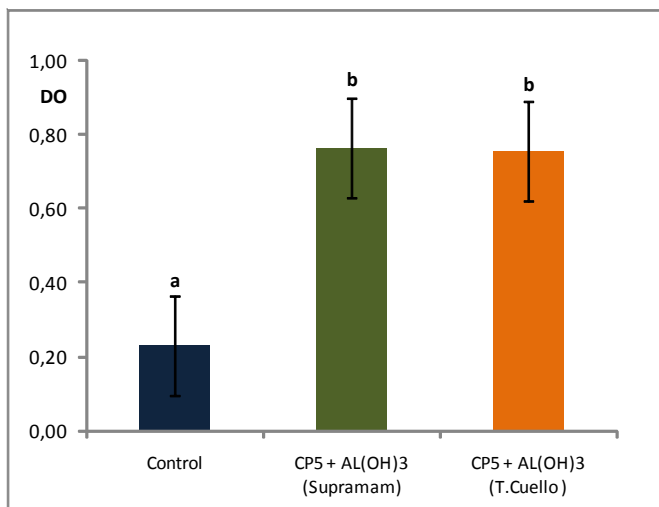


Figura 2: Niveles promedio de IgG en leche de vaquillonas inmunizadas por dos vías de inoculación distintas con una bacterina tipo capsular 5 de *Staphylococcus aureus* a los 14 días post parto. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas.

diferencias entre niveles de IgG total fueron significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos, obteniéndose el mayor título en el grupo vacunado en el área supramamaria, alcanzando valores de DO máximos 4 veces superiores al nivel basal a los 21 días luego de la aplicación de la dosis de refuerzo. En el último muestreo realizado (+14), los niveles de IgG total de ambos grupos vacunados difirieron significativamente del control ($p < 0,05$), aunque no se detectaron diferencias significativas entre ellos. En cuanto a los valores en leche, los niveles de IgG específicos resultaron significativamente superiores en los grupos vacunados respecto del control ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias en título de IgG total entre ambos grupos de vaquillonas vacunadas.

DISCUSIÓN

La conjugación de CP con proteínas incrementa la producción de anticuerpos específicos contra los CP (Fattom *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1994), presumiblemente por activación de los linfocitos T y los mecanismos de respuesta inmune ligados a ellos (Mond *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha demostrado que las vacunas a bacterias enteras conteniendo CP generan una respuesta inmune más intensa que las obtenidas con CP conjugados a proteínas (Tollersrud *et al.*, 2001).

En el presente estudio, el grupo vacunado en el área supramamaria, mostró títulos de IgG total en suero significativamente superiores a los obtenidos por inoculación en la tabla del cuello. Existe escasa información acerca de las respuestas inmunes humorales obtenidas utilizando distintas vías de inoculación. Un incremento de los títulos de IgG1 e IgG2 anti CP en el periparto fue observado por Guidry *et al.* (1994) en suero de vacas

inmunizadas en el área del ganglio supramamario con una bacterina tipo CP2 adyuvada con sulfato de dextran, comparado con animales inmunizados con el mismo inmunógeno por vía intramamaria.

En otros casos se utilizó una sola vía de inoculación o la combinación de dos vías distintas. Tollersrud *et al.* (2001) inocularon vaquillonas de 3 a 11 meses con una bacterina CP5 de la cepa *S. aureus* Reynolds emulsionada con un adyuvante oleoso (Montanide ISA70) en forma subcutánea en el área del ganglio supramamario, obteniendo el mayor título de IgG total a los 40 días luego de la segunda dosis. Luby *et al.* (2007) utilizaron dos dosis de una bacterina comercial (Lysigin®) conteniendo *S. aureus* CP5, CP8 y tipo 336 inoculada en forma subcutánea con 28 días de intervalo en la tabla del cuello, observando, antes de la segunda inoculación, títulos de IgG total, IgG1 e IgG2 en suero significativamente elevados respecto del nivel basal. Asimismo, Lee *et al.* (2005) observaron un incremento de los títulos de IgG1 e IgG2 en suero tras la inoculación de una bacterina trivalente conteniendo tipos capsulares 5, 8 y 336 por vía intramuscular y en el área del ganglio supramamario formulada con adyuvante incompleto de Freund o hidróxido de aluminio, aunque la intensidad de la respuesta de anticuerpos varió frente a los distintos tipos capsulares. Por el contrario, Nickerson *et al.* (1993) no encontraron diferencias en los títulos de IgG total en vacas inmunizadas con una preparación conteniendo bacterina y toxoide de la cepa *S. aureus* JG80 formulada con adyuvante incompleto de Freund inoculada por vía subcutánea en el área supramamaria o intramuscular en el glúteo. Cabe destacar que, en los estudios mencionados, se utilizaron no solo distintas formulaciones, sino que los regímenes de inoculación fueron también diferentes, ya que en los primeros dos casos se

utilizó una dosis inicial al secado (Guidry *et al.*, 1994) o un mes antes de la fecha probable de parto de las vaquillonas (Lee *et al.*, 2005) y dos dosis de refuerzo con intervalo de 15 días entre cada una de ellas (Guidry *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2005); mientras que en el último caso, se utilizaron animales no preñados, inoculándose una dosis inicial al secado y una dosis refuerzo seis semanas después (Nickerkson *et al.*, 1993).

El título de IgG total en leche a los 14 días post parto fue superior en ambos grupos vacunados comparados con el control ($p < 0,05$), pero no se detectaron diferencias entre ambos grupos vacunados. Guidry *et al.* (1994) observaron un incremento significativo del título de IgG1 en leche de vacas inmunizadas por vía subcutánea en el área supramamaria en comparación con vacas inmunizadas por vía intramamaria. Además, el título de IgG2 en leche se mantuvo significativamente elevado en vacas inmunizadas por vía subcutánea en el área del ganglio supramamario, comparado con vacas inmunizadas por vía intramamaria (Guidry *et al.*, 1994).

En conclusión, en este estudio se utilizó una bacteria del tipo CP5, considerado el más prevalente en aislamientos de *S. aureus* en Argentina. La inoculación de esta bacteria por vía subcutánea en el área del ganglio supramamario generó un mayor título de IgG total en suero desde el día -14 al +7 relativo a la fecha de parto. Los títulos de IgG en leche fueron significativamente superiores en ambos grupos vacunados respecto del control, aunque no se detectaron diferencias entre ambas vías.

BIBLIOGRAFIA

- BROCK, J. H.; E. D. STEEL & B. REITER.** 1975. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. Res. Vet. Sci. 19:152.
- CALVINHO, L. F. & TIRANTE, L.** 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. Rev. FAVE, Sección Cs. Vet. 4: 29-40.
- CAMUSSONE, C.; A. SCHWAB; P. REJF; N. PUJATO; I. MARCIPAR & L. CALVINHO.** 2008. Determinación de tipos capsulares en *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovinas por métodos genotípicos y fenotípicos. XVII Reunión científica técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. B7.
- CUNNION, K. M.; H. M. ZHANG & M. M. FRANK.** 2003. Availability of complement bound to *Staphylococcus aureus* to interact with membrane complement receptors influences efficiency of phagocytosis. Infect Immun. 71: 656-662.
- FATTOM, A.; R. SCHNEERSON; D.C. WATSON; W. W. KARAKAWA; D. FITZGERALD; I. PASTAN; X. LI; J. SHILOACH; D. A. BRYLA & J. B. ROBBINS.** 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. Infect Immun. 61: 1023-32.
- FITZPATRICK, J.L.; P.J. CRIPPS; A.W. HILL; P. W. BLAND; C. R. STOKES.** 1992. MHC class II expression in the bovine mammary gland. Vet. Immunol. Immunopathol. 32:13-23.
- GILBERT, F. B.; B. POUTREL & L. SUTRA.** 1994. Immunogenicity in cows of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide-ovoalbumin conjugate. Vaccine 12:369-374.
- GIRAUDO, J. A.; A. CALZOLARI; H.**

- RAMPONE; A. RAMPONE; A.T. GIRAU-DO; C. BOGNI; A. LARRIESTRA & R. NAGEL.** 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J. Dairy Sci.* 80:845-853.
- GUIDRY, A. J.; C. N. O'BRIEN; S.P. OLIVER; H. H. DOWLEN & L.W. DOUGLASS.** 1994. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. *J Dairy Sci.* 77: 2965-2974.
- HOGAN, J. S.; R.N. GONZALEZ; R.J. HARMON; S.C. NICKERSON; S.P. OLIVER; J.W. PANKEY & K.L. SMITH.** 1999: Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council Inc. Madison, WI. Pp. 207.
- LEE, J. W.; C. N. O'BRIEN; A. J. GUIDRY; M. J. PAAPE; K.A. SHAFER-WEAVER & X. ZHAO.** 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. *Can J Vet Res.* 69:11-18.
- LUBY, C. D.; J. R. MIDDLETON; J. MA; C.L. RINEHART; S. BUCKLIN; C. KOHLER & J.W. TYLER.** 2007. Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a *Staphylococcus aureus* bacterin (Lysigin™). *J. Dairy Res.* 74:239-246.
- MA, J.; J. COCCHIARO & J. C. LEE.** 2004. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J Dairy Sci.* 87:178-82.
- MIDDLETON, J. R.; C. D. LUBY & D.S. ADAMS.** 2009. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Vet Microbiol.* 134:192-8. Review.
- MOND, J. J.; A. LEES & C.M. SNAPPER.** 1995. T cell-independent antigens type 2.
- NICKERSON, S.C.; W.E. OWENS & R.L. BODDIE.** 1993. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection, and mammary histology in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:1290-1297.
- NONNECKE, B.J.; L.A. ELSKEN & M.E. KEHRLI JR.** 1986. Local and systemic immune response in the cow after intramammary vaccination during lactation. *Vet Immunol Immunopathol.* 11:31-44.
- SCHULTZE, W. D. & M. J. PAAPE.** 1984. Effect on outcome of intramammary challenge exposure with *Staphylococcus aureus* of somatic cell concentration and presence of an intramammary device. *Am. J. Vet. Res.* 45:420.
- TOLLERSRUD, T.; L. ZERNICHOW; S.R. ANDERSEN; K. KENNY & A. LUND.** 2001. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine* 19:3896-3903.
- ZECCONI, A.; L.F. CALVINHO & L. FOX.** 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 408/2006. Pp. 30 FIL-IDF ISSN 0250-5118