



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCION SALUD ANIMAL**

**ESTUDIO DE TIPOS CAPSULARES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
AISLADOS DE MASTITIS BOVINA Y RESPUESTA INMUNE A UNA
BACTERINA DE TIPO CAPSULAR 5 EN BOVINOS**

Autora: Vet. Paula Karina Rejf

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

Esperanza, 23 de septiembre de 2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS

MENCIÓN SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE TIPOS CAPSULARES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

AISLADOS DE MASTITIS BOVINA Y RESPUESTA INMUNE A UNA

BACTERINA DE TIPO CAPSULAR 5 EN BOVINOS

Autora: Vet. Paula Karina Rejf

Director: M.V. PhD Luis Fernando Calvinho

Codirector: Dr. Iván Sergio Marcipar

Jurado

Dra. Cristina Bogni

Dra Bibiana Dallard

M.V. M. Sc. Onelia Lavaroni

DEDICATORIA

Con amor a:

Mi madre que me contiene y me apoya en cada día de mi vida y a mi padre que me brindó todo lo que tuvo para que pueda ser la persona que soy y que este donde este me sigue dando fuerzas para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar un profundo agradecimiento al Dr. Luis Calvino, por ser mi director, y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Dr. Hugo Ortega, por brindarme su ayuda constante permitiendo que pueda realizar mis investigaciones en su laboratorio.

Al Dr. Carlos Peralta, por haber estado siempre. Por escucharme, por aconsejarme y por ser la persona que fue.

Al M.V. Armando Delgado, por su colaboración.

A Cecilia Camussone, por colaborar y auxiliarme cada vez que lo necesité.

A mis amigas y compañeras de maestría Rocío Marini y Luz Ducommun por estar siempre y alentarme a seguir adelante.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias, y a la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la posibilidad, gracias a la beca otorgada de realizar este estudio de posgrado.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	V
INDICE DE IMÁGENES.....	V
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VIII
I- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Aspectos generales.....	2
I.2. Hipótesis.....	5
I.3. Objetivos.....	5
I.4. Generales.....	5
I.5. Específicos.....	6
II- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
II.1. Introducción.....	8
II.2. Aspectos generales sobre factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	10
II.2.1. Componentes superficiales.....	12
II.2.1.1. Polisacáridos Capsulares.....	12
II.2.1.2. Polisacárido Extracelular.....	13
II.2.1.3. Proteínas Superficiales.....	14

II.2.2. Toxinas y Enzimas Extracelulares.....	16
II.2.2.1. Toxinas con actividad sobre membranas.....	16
II.2.2.2. Toxinas con actividad de superantígeno.....	19
II 2.2.3. Enzimas extracelulares.....	21
II.2.3. Regulación genética de los factores de virulencia.....	22
II.2.4. Regulación genética frente al estrés oxidativo.....	23
II.2.5. Polisacáridos Capsulares.....	24
II.2.5.1. Bioquímica capsular.....	27
II.2.5.2. Serotipos capsulares 1 y 2.....	27
II.2.5.3. Rol de las cápsulas tipo 1 y 2 en la virulencia.....	28
II.2.5.4. Polisacáridos capsulares tipo 5 y 8.....	28
II.2.5.5. Producción de cápsula <i>in vitro</i>	29
II.2.5.6. Producción de cápsula <i>in vivo</i>	30
II.3. Slime y Biofilm.....	30
II.3.1. Formación del biofilm.....	33
II.4: Aspectos de la respuesta inmune de la glándula mamaria bovina	37
II.4.1. Susceptibilidad a infecciones.....	37
II.4.2. Inmunidad glandular.....	39
II.4.3. Defensas anatómicas.....	42
II.4.4. Defensas celulares.....	43
II.4.5 Defensas solubles.....	51
II.5. Vacunas.....	59
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	63

III.1. Materiales y métodos del objetivo N° 1	64
III.1.2. Aislamientos bacterianos.....	64
III.1.3. Genotipificación de polisacáridos capsulares.....	66
III.1.4. Tipificación serológica.....	67
III.1.4.1 Anticuerpos.....	67
III.1.4.2 Aislamiento y purificación de CP.....	67
III.1.4.3. Enzimo inmuno ensayo.....	68
III.1.5. Análisis estadístico.....	69
III.2. Materiales y métodos del Objetivo N° 2.....	69
III.2.1. Vacuna experimental.....	69
III.2.2. Animales experimentales y diseño experimental.....	70
III.2.3. Frecuencia de muestreos y tipo de muestras.....	71
III.2.4.Cultivos bacteriológicos	71
III.2.5.Métodos serológicos.....	72
III.2.6 Análisis estadísticos.....	72
IV- RESULTADOS.....	74
IV.1.Resultados objetivo N° 1.....	75
IV.1.1.Genotipificación.....	75
IV.1.2.Tipificación serológica.....	77
IV.2. Resultados objetivo N° 2.....	79
V- DISCUSIÓN.....	81
V.1. Objetivo N°1.....	82

V.2. Objetivo N°2.....	87
VI- CONCLUSIONES.....	90
VI.1. Objetivo N°1.....	91
VI.2. Objetivo N°2.....	91
VII- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Factores asociados con la virulencia de <i>S. aureus</i>	11
Tabla 2	Resumen de las defensas celulares de la glándula mamaria.	45
Tabla 3	Efecto de las citoquinas en la respuesta inflamatoria e inmune en glándula mamaria.	58
Tabla 4	Esquema de vacunación, tipos de muestras y frecuencia de muestreo.	71
Tabla 5	Distribución de genotipos capsulares 5 y 8 entre aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de infecciones intramamarias bovinas en cuatro provincias de la Argentina. ...	77
Tabla 6	Distribución de los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de infecciones intramamarias bovinas en cuatro provincias de Argentina.	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Título promedio de IgG total en suero de vaquillonas inmunizadas por dos vías de inoculación distintas con una bacterina tipo capsular 5 de <i>Staphylococcus aureus</i>	80
Figura 2	Título de IgG promedio en leche de vaquillonas inmunizadas por dos vías de inoculación distintas con una bacterina tipo capsular 5 de <i>Staphylococcus aureus</i> a los 14 días post parto. .	80

INDICE DE IMÁGENES

Imagen 1	Gel de agarosa donde se visualizan las bandas de amplificación para los tipos capsulares.	76
-----------------	---	----

RESUMEN

Staphylococcus aureus es un patógeno contagioso que produce infecciones intramamarias (IIM) en bovinos con tendencia a la cronicidad y refractariedad a la terapia antibiótica, causando elevadas pérdidas económicas. Las dificultades para controlar las IIM producidas por este organismo a partir de los métodos clásicos, ha llevado a desarrollar alternativas de control no antibiótico, incluyendo la inmunización. Este microorganismo produce polisacáridos capsulares (CP) que han sido incluidos tanto en inmunógenos experimentales como comerciales. Dentro de estos CPs, los de mayor prevalencia, tanto en aislamientos de origen humano como de rumiantes, son los tipos CP5 y CP8. Este trabajo tuvo como objetivo determinar por métodos genotípicos y fenotípicos la prevalencia y distribución de tipos de polisacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus*, aislados a partir de muestras provenientes de vacas con IIM de diferentes cuentas lecheras de Argentina. El 52,87% de los aislamientos fueron genotipificados como *cap5*, mientras que el 11,46% lo fue como *cap8*; mientras que el resto de los aislamientos, 35,49%, no fueron tipificables (NT). En cuanto al origen de los aislamientos, se demostró que entre aquellos aislamientos provenientes de casos de IIM clínicas, el 72,1%, fueron genotipificados como *cap5* o *cap8*, mientras que solamente un 27,9% fueron NT. De 91 aislamientos de IIM subclínicas, el 58,2%, fueron tipificados como *cap5* o *cap8* y el 41,8%, como NT. El 50% de los aislamientos genotipificados como *cap5* y *cap8* demostraron, por el método de ELISA, expresar el fenotipo capsular. El 38,6% reaccionó con el suero anti CP5 y el 11,9% con anti CP8.

Los intentos para controlar las IIM causadas por *S. aureus* a través de la vacunación han comprendido diferentes tipos de vacunas, utilizando diferentes adyuvantes como así también diferentes vías de inoculación, con el objetivo de aumentar la respuesta inmune de los animales. En este estudio se elaboró una bacterina con una cepa de referencia (Reynolds), productora de CP5, la cual fue inoculada en forma subcutánea por dos vías distintas, tabla del cuello y área supramamaria en dos grupos de vaquillonas, dejando un grupo control sin inocular. Se evaluó la respuesta inmune humoral en suero y leche por el método de ELISA. Se determinó el promedio de los títulos de IgG total específicos obtenidos en suero de sangre y leche respectivamente, para cada grupo evaluado, observándose que en ambos casos los animales vacunados presentaron niveles de anticuerpos significativamente mayores al de los no vacunados ($P < 0,05$). A partir del día 14 antes del parto hasta el día 7 post parto las diferencias entre títulos de IgG total fueron significativas ($P < 0,05$) entre los tres grupos, obteniéndose el mayor título en el grupo vacunado en el área supramamaria.

En cuanto a los valores en leche, los niveles de IgG específicos resultaron significativamente superiores en los grupos vacunados respecto del placebo ($P < 0,05$). No se detectaron diferencias en título de IgG total entre ambos grupos de vaquillonas vacunadas.

Palabras Clave: *Staphylococcus aureus*, polisacáridos capsulares, infección intramamaria, bacterina, respuesta inmune, área del ganglio supramamario.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a contagious pathogen that causes chronic intramammary infections (IMI) refractory to antibiotic therapy, leading to high economic losses. Classical mastitis control programs are based on hygiene during milking time and antibiotic therapy. Although these practices can control *S. aureus* IMI to some extent, alternative “non antibiotic” approaches have been proposed in an attempt to further control this disease. Capsular polysaccharides 5 and 8 are the most prevalent types among bovine *S. aureus* isolated from IMI. However, frequency and distribution of CP5 and CP8 varies between countries. The objectives of this study were to determine by a PCR technique the capsular genotype of *S. aureus* isolated from the four major dairy provinces of Argentina and capsular expression by a conventional serological method. One hundred and fifty seven *S. aureus* isolates from IMI were evaluated for the presence of *cap5* and *cap8* loci by a PCR technique. Isolates carrying *cap5* and *cap8* were serotyped using polyclonal antisera against CP5 and CP8. Eighty three (52.87%) and 18 (11.46%) isolates were genotyped as *cap5* and *cap8*, respectively. Capsular polysaccharide genotype distribution and proportion of nontypeable isolates varied between provinces; however, differences were not significant. Fifty percent of isolates genotyped as *cap5* and *cap8* were shown to express CP5 or 8 by serological typing. Although the number isolates expressing CPs was lower than in other countries, the genotype analysis underscores the importance of considering CP5 and 8 for rational design of mastitis vaccines in Argentina.

Attempts to control *S. aureus* IMI through vaccination have involved the use of different types of antigens, adjuvants and inoculation routes aiming to enhance immune responses. It has been shown that antibodies directed against CP favour opsonophagocytosis. The aim of this study was to evaluate the humoral immune response against a *S. aureus* bacterin of a reference CP5 type strain (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 subcutaneously in the neck and a third group remained as a non vaccinated control. Levels of total IgG were assessed in sera and whey by an ELISA technique. Vaccinated animals showed significantly higher IgG levels than non vaccinated controls. In addition, heifers vaccinated through the SMLA route showed the highest IgG levels in sera. IgG levels in whey were higher in vaccinates than controls, although differences between inoculation routes were not detected. There was no difference in total IgG in both groups of vaccinated heifers.

Key words: *Staphylococcus aureus*, intramammary infection, capsular polysaccharides, bacterin, supramammary lymph node area, immune response.

I-INTRODUCCIÓN

I-INTRODUCCIÓN

I.1. Aspectos generales

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que mayores pérdidas ocasiona al productor y a la industria láctea (Bramley *et al.*, 1996). La glándula mamaria bovina esta expuesta a diversas bacterias tanto durante el período de lactancia como el de vaca seca. (Zhao y Lacasse, 2008). Si bien esta enfermedad es causada por numerosos agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno mayor de la ubre más frecuentemente aislado de casos de mastitis tanto en la Argentina (Calvinho y Tirante 2005), así como en otros países (Zecconi *et al.*, 2006).

Los programas de control de mastitis que se aplican en la actualidad, fueron desarrollados durante la década del 60 y están basados en la higiene durante el ordeño, la terapia antibiótica y el descarte de las vacas infectadas crónicamente (Booth, 1975). Sin embargo, las particulares características patogénicas de este organismo determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y curativas tradicionales (Zhao y Lacasse, 2008). Por consiguiente, se han propuesto medidas de control complementarias que contemplan la manipulación de las defensas del hospedador a través del uso de inmunógenos (Yancey, 1999).

Desde épocas tempranas se realizaron numerosos intentos para inmunizar animales contra esta enfermedad (Munch-Petersen, 1938). La falta de éxito de aquellos, así como de más recientes esfuerzos, se ha debido entre otras razones al uso de vacunas y protocolos de vacunación extrapolados de otras enfermedades infecciosas y al insuficiente conocimiento sobre factores de virulencia bacteriana y

mecanismos inmunes de la glándula mamaria bovina (Anderson, 1976; Colditz y Watson, 1985; Watson *et al.*, 1993; Yancey, 1999).

En las últimas décadas se dirigieron sustanciales esfuerzos para identificar tanto los factores bacterianos involucrados en la patogénesis de la mastitis estafilocócica como los mecanismos de respuesta inmune de la glándula mamaria bovina, lo cual permitió lograr mayores avances en la inmunización contra esta enfermedad (Sutra y Poutrel, 1994; Kerro Deigo *et al.*, 2002). Dentro de los factores bacterianos se centró la atención en aquellos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, estimulando a su vez las defensas de la glándula mamaria bovina, como las toxinas α y β , proteína A, proteínas de unión a la fibronectina (FNBP), al fibrinógeno (FgBP) y polisacáridos capsulares (CP) (Yancey, 1993). Los polisacáridos capsulares son considerados importantes en la patogénesis de la enfermedad ya que confieren propiedades antifagocíticas *in vitro* y se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra éstos favorecen la opsonofagocitosis (Karakawa *et al.*, 1988; Guidry *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1992). Sin embargo, los CP estimulan pobremente la respuesta inmune y existirían marcadas diferencias regionales en la distribución de los distintos serotipos (Tollersrud *et al.*, 2000; O’Riordan y Lee, 2004).

En las vacunas que se han desarrollado para el control de mastitis por *S. aureus* se han incluido componentes pseudocapsulares y capsulares, algunos de los cuales mostraron ser efectivos en ensayos de campo para reducir la incidencia de infecciones intramamarias (IIM) subclínicas y clínicas causadas por este microorganismo (Giraud *et al.*, 1997; Nickerson *et al.*, 1993; Nordhaug *et al.*, 1994; Watson y Schwartzkoff, 1990). Asimismo, se han realizado intentos para inmunizar bovinos contra mastitis estafilocócica utilizando polisacáridos capsulares. Estos son

antígenos T-independientes que estimulan pobremente la respuesta inmune. Para superar estas dificultades, los CP prevalentes en determinadas zonas geográficas han sido ligados a distintas proteínas portadoras, utilizándose distintos métodos de conjugación (Kerro Deigo *et al.*, 2002).

El CP tipo 5, el tipo serológico de CP predominante en Europa fue conjugado con proteínas portadoras como ovoalbúmina (Gilbert *et al.*, 1994), toxina alfa (Herbelin *et al.*, 1997) o seroalbúmina humana (Tollersrud *et al.*, 2000), obteniéndose una respuesta inmune basada en la producción de IgG1 e IgG2, reconocidas por su actividad opsonofagocítica. También se generaron inmunógenos experimentales compuestos por proteínas de fusión comprendiendo el dominio de unión a la fibronectina de *S. aureus* (Mamo *et al.*, 1994). Recientemente se evaluaron vacunas compuestas por fragmentos bacterianos insolubles y lisados de cultivos de *S. aureus* conteniendo distintos antígenos somáticos que confirieron protección a los animales vacunados (Leitner *et al.*, 2000; Nickerson *et al.*, 2000). En la mayoría de los casos, las vacunas desarrolladas contuvieron componentes de la superficie bacteriana presentes en algunas cepas o tipos, confiriendo fundamentalmente protección contra estas cepas o tipos homólogos, obteniéndose en algunos casos un control parcial de la infección por ese organismo.

Se han realizado numerosos intentos para estimular la producción de anticuerpos opsonizantes en la secreción láctea, utilizando varios adyuvantes y distintas vías de inoculación; como la intramamaria (IMa), intramuscular, linfonodular o vía subcutánea, obteniéndose diversos resultados (Brock *et al.*, 1975; Adlam *et al.*, 1981; Guidry *et al.*, 1994).

I.2. Hipótesis

El conocimiento de la prevalencia y distribución de los tipos de polisacáridos capsulares de aislamientos de *Staphylococcus aureus* de mastitis bovina en distintas regiones geográficas permite la elección de cepas para inmunizar vacas de rodeos lecheros para lograr una mayor respuesta inmune específica. La vía de inoculación puede tener influencia en la intensidad de la respuesta inmune humoral.

I.3. Objetivos

I.3.1. Generales

- 1- Determinar por métodos genotípicos y fenotípicos la prevalencia y distribución de tipos de polisacáridos capsulares en aislamientos de *Staphylococcus aureus* de infecciones intramamarias (IIM) de vacas pertenecientes a rodeos lecheros de distintas cuencas de Argentina.
- 2- Evaluar la respuesta inmune humoral a una bacterina formulada con una cepa de referencia del tipo capsular más prevalente entre aislamientos de *Staphylococcus aureus* de IIM de vacas de rodeos de distintas cuencas utilizando diferentes vías de inoculación.

I.3.2. Específicos

Objetivo N°1

- 1- Aislar e identificar cepas de *S. aureus* a partir de muestras de leche bovina.
- 2- Genotipificar los polisacáridos capsulares de las cepas aisladas.
- 3- Generar antisueros contra los polisacáridos CP5 y CP8.
- 4- Aislar y purificar los polisacáridos capsulares.
- 5- Tipificar por serología las cepas de *S. aureus* genotipificadas.

Objetivo N°2

- 1- Formular una vacuna experimental a partir de una cepa de *S. aureus* Reynolds.
- 2- Inocular vaquillonas preñadas con la vacuna experimental en forma subcutánea en el área supramamaria y en la tabla del cuello.
- 3- Extraer muestras de sangre y leche a intervalos periódicos para evaluar por el test de ELISA el título de anticuerpos.
- 4- Comparar la respuesta inmune humoral generada por ambas vías.

II-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II-REVISIÓN IBLIOGRÁFICA

II.1. Introducción

La mastitis es una enfermedad compleja que puede definirse como la inflamación de la glándula mamaria. Esta patología ocurre primariamente en respuesta a una infección bacteriana intramamaria, aunque puede estar causada además por agentes fúngicos o daños de tipo traumático, térmico o químico. La ocurrencia de la mastitis depende de la tríada compuesta por la interacción entre el hospedador, el agente y los factores ambientales (Zhao y Lacasse 2008).

La mastitis es la enfermedad infecciosa más costosa en términos económicos que afecta mundialmente, tanto al ganado lechero, como a la industria láctea. (Wellenberg *et al.*, 2002; Rabello *et al.*, 2005). La prevalencia de esta enfermedad es relativamente elevada en este tipo de animales (Wellenberg *et al.*, 2002; Rabello *et al.*, 2005). La mastitis subclínica es la principal forma de esta enfermedad en los rodeos lecheros (Wilson *et al.*, 1997; Pitkala *et al.*, 2004). El 70% de las pérdidas están asociadas a la reducción de la producción de leche, debida sobre todo al daño irreversible que se produce en el tejido mamario (Oliver y Calvinho, 1995). La glándula mamaria infectada produce un 5% menos de leche por cada incremento en 100.000 en el recuento de células somáticas (RCS) adicionales por ml de leche (Bedolla *et al.*, 2008).

Muchos de los costos son atribuibles también a la leche descartada, los reemplazos de vaca/año y los costos para los tratamientos médicos veterinarios (Booth, 1981; Kerr *et al.*, 2001; Ceron-Muñoz *et al.*, 2002; Nash *et al.*, 2003, Bedolla

et al., 2008). Las pérdidas mundiales anuales debido a la mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos (Wellenberg *et al.*, 2002; O'Flaherty *et al.*, 2005). En la Argentina los trabajos realizados por ALMAST (Asociación Argentina de Lucha Contra Mastitis), son coincidentes con los realizados en otros países, que estiman que las pérdidas por vaca por año oscilan entre U\$S 90 a 184 (Blosser, 1979, Crist *et al.*, 1997, Jones, 1998).

Las bacterias que causan mastitis, pueden ser categorizadas como organismos patógenos contagiosos y ambientales (Watts, 1988). Los patógenos contagiosos viven y se multiplican en la glándula mamaria infectada y se diseminan de animal a animal principalmente durante el ordeño. Uno de los microorganismos más importantes es *Staphylococcus aureus* el cual es el patógeno mayor de la ubre más frecuentemente aislado de casos de mastitis en la Argentina (Calvinho y Tirante, 2005), así como en otros países (Zecconi *et al.*, 2006). Este organismo contamina el orificio del pezón, persiste y multiplica allí y luego ingresa al canal del pezón, ya sea por colonización progresiva o por cambio en la presión intramamaria particularmente al final del ordeño (Anderson, 1983). Es un microorganismo contagioso, y la transferencia durante el ordeño es considerada un importante mecanismo de dispersión de esta bacteria de vaca a vaca (Bramley *et al.*, 1984). Los bovinos también están expuestos a *S. aureus* durante el parto y algunos autores sugieren que la leche de vacas infectadas es probablemente una fuente de microorganismos para producir IIM en terneras (Roberson *et al.*, 1998).

Staphylococcus aureus produce infecciones de tipo clínicas o subclínicas que tienden a la cronicidad y responden pobremente a la terapia antibiótica (Anderson, 1983; Vasudevan *et al.*, 2003) y una vez establecido en la glándula mamaria es muy

difícil de erradicar (Nickerson, 1999); ya que posee un gran número de potenciales factores de patogenicidad que le permiten colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de tejidos (Dinges *et al.*, 2000; Kerro Deogo *et al.*, 2002).

II.2. Aspectos generales sobre factores de virulencia de *S. aureus*

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, inmóvil, aerobio o anaerobio facultativo, que microscópicamente se agrupa en forma de racimo, con un tamaño entre 0,5 a 0,8 micras. Este microorganismo produce una gran cantidad de factores de virulencia que comprenden productos de secreción, componentes estructurales y mecanismos que contribuyen para favorecer la habilidad de la bacteria para sobrevivir en el hospedador y causar mastitis (Kerro Deogo *et al.*, 2002). La patogenicidad de *S. aureus* depende de una acción combinada de más de cuarenta factores de virulencia que incluyen toxinas extracelulares, enzimas y proteínas de superficie celular (Arvidson y Tegmark, 2001). **Tabla 1.**

Factores de virulencia asociados a <i>Staphylococcus aureus</i>	
Componentes superficiales	<ul style="list-style-type: none"> • Polisacárido capsular • Polisacárido extracelular • Proteínas superficiales: <ul style="list-style-type: none"> - Proteínas de unión a colágeno (Cna). - Proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB). - Proteínas de unión a fibrinógeno (ClfA y ClfB). - Proteína A (Spa). - <i>Clumping factor</i>. - Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.
Toxinas y enzimas extracelulares	<ul style="list-style-type: none"> • Toxinas con actividad sobre membranas <ul style="list-style-type: none"> - Toxinas o hemolisinas α, β, γ, δ. - Leucocidina. • Toxinas con actividad de superantígenos <ul style="list-style-type: none"> - Enterotoxinas (A-E y G-J). - Toxina del síndrome del choque tóxico1 (TSST-1). - Toxinas epidermolíticas o exfoliativas (A y B). • Enzimas extracelulares <ul style="list-style-type: none"> - Estafiloquinasa. - Coagulasa. - Hialuronidasa. - Lipasas. - Proteasas. - ADNasa termoestable o termonucleasa. - Catalasa. - Colagenasa. - Fosfatasa. - Elastasa. - Betalactamasa. - Hidrolasa.

Tabla 1. Factores asociados con la virulencia de *S. aureus*. Adaptación Martínez Pulgarín, (2005).

Otros autores, sin embargo, basándose en su actividad biológica, han propuesto la división de los factores de virulencia de *S. aureus* en tres categorías funcionales (Kerro Deogo *et al.*, 2002):

- Factores que median la adhesión de la bacteria a la célula hospedadora.
- Factores que promueven el daño y la diseminación tisular.
- Factores que protegen a la bacteria del sistema inmune del hospedador.

Para detallar el papel que desempeñan estos factores en la patogénesis de *S. aureus* se utilizará la clasificación clásica, puesto que algunos factores pueden ser englobados en varias categorías funcionales.

II.2.1. Componentes superficiales

Dentro de este grupo se incluyen el polisacárido capsular, el polisacárido extracelular y las proteínas superficiales.

La superficie de *S. aureus* consta de dos estructuras, la pared celular y la membrana celular (Costerton *et al.*, 1981; Wilkinson, 1983). Los componentes más definidos de la pared son el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y la proteína A (Costerton *et al.*, 1981; Wilkinson, 1983).

II.2.1.1. Polisacáridos capsulares

Se han descrito para *S. aureus*, 11 serotipos de polisacárido capsular (CP) (tipos 1 al 11), siendo el CP5 y el CP8 los más frecuentes (70%) dentro de las cepas

humanas y de rumiantes (Baselga *et al.*, 1994). El polisacárido capsular varía con el tipo de cepa y puede definirse como estructuras microcapsulares flexibles también conocido como *slime*, o rígidas como la cápsula. El papel del *slime* en la patogénesis no está del todo claro, parece ser que podría participar en la evasión del sistema inmune aumentando la resistencia de las bacterias a la fagocitosis (Thakker *et al.*, 1998; Luong y Lee, 2002), así como en la adherencia de *S. aureus* a los tejidos del hospedador (Aguilar *et al.*, 2001). La producción de estos exopolisacáridos es iniciada *in vivo* cuando la bacteria se está multiplicando en la leche. La cápsula tiene también una función antifagocitaria, retrasando la quimiotaxis y la fagocitosis (Sandgren *et al.*, 1991).

II.2.1.2. Polisacárido extracelular

Staphylococcus aureus expresa también un polisacárido extracelular poli-N-succinil- β -1-6-glucosamina denominado PIA/PNSG (McKenney *et al.*, 1999), responsable de la formación de películas bacterianas o biofilms (colonias adherentes rodeadas por una gran matriz de polisacárido) junto con la proteína *bap* (proteína asociada a biofilm) (Cucarella *et al.*, 2001). La proteína *bap* promueve tanto la unión a superficies inertes como la adhesión intercelular, mientras que PIA/PNSG parece estar implicado únicamente en la adhesión intercelular (Cucarella *et al.*, 2002). Muchas infecciones crónicas están asociadas con estirpes productoras de biofilms, debido a que son muy difíciles de eliminar por fagocitosis y no responden bien al tratamiento antibiótico (Costerton *et al.*, 1999; Cucarella *et al.*, 2004).

II.2.1.3. Proteínas superficiales

El primer paso en el establecimiento de la infección consiste en la adherencia a los tejidos del hospedador. *S. aureus* utiliza diferentes proteínas superficiales que están ancladas en la pared celular bacteriana para adherirse a varios componentes de la matriz extracelular. En este grupo se engloban las proteínas de unión al colágeno (Cna), a la fibronectina (FnBPA y FnBPB) y al fibrinógeno (ClfA y ClfB), así como la proteína A. Estas proteínas en conjunto se denominan MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) (Foster y Höök, 1998).

La proteína A (Spa) es un componente de superficie de la mayoría de las cepas virulentas de *S. aureus* y está presente en el 50-60% de las cepas aisladas de IIM bovinas (Wilkinson, 1983; Sutra y Poutrel, 1994). Aunque no se conoce con certeza su papel en la patogénesis, se ha sugerido que posee una actividad antifagocítica, especialmente durante los estadios tardíos de la infección intramamaria, ya que altera la respuesta inmune del hospedador mediante la disminución de la opsonización y la fagocitosis porque es capaz de unirse a la fracción Fc de las IgG impidiendo la unión de la bacteria a los receptores específicos de las células del sistema inmune (Gemmell *et al.*, 1990; Sutra y Poutrel, 1994). Además, recientemente se ha demostrado que la proteína A puede actuar como un factor de colonización ya que se adhiere al factor von Willebrand, una proteína importante en el proceso de hemostasis (Hartleib *et al.*, 2000).

En las infecciones por *S. aureus* son las proteínas de unión a la fibronectina y al colágeno, principalmente, las que permiten la adherencia de la bacteria a microlesiones del epitelio, donde quedan expuestos la lámina basal y el tejido

conjuntivo ricos en fibronectina y colágeno (Sutra y Poutrel, 1994). Las proteínas de unión a fibronectina están implicadas, además, en la adherencia de *S. aureus* a las células del hospedador y su posterior internalización (Dziewanowska *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2000; Massey *et al.*, 2001).

El *clumping factor* es una proteína que aglutina las bacterias con producción de fibrina (Lindahl *et al.*, 1990), y se considera que está involucrado en la inhibición de la fagocitosis.

Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos son sustancias que actúan como receptores para la adhesión a las células de tipo epitelial (Aly y Levit 1987).

La adhesión temprana de *S. aureus* a las células epiteliales mamarias juega un rol muy importante en la prevención de la remoción bacteriana por el *flushing* de la leche y los efectos perjudiciales de los mecanismos de defensa del hospedador. (Kerro Dego, 2002).

Aunque *S. aureus* ha sido tradicionalmente considerado como un patógeno extracelular, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que es capaz de adherirse y ser internalizado por una gran variedad de tipos celulares, pudiendo sobrevivir y, en ocasiones, multiplicarse en el interior de células epiteliales (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Kahl *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 2003), endoteliales (Hamill *et al.*, 1986; Yao *et al.*, 1995; Menzies y Kourteva, 1998), fibroblastos (Fowler *et al.*, 2000), osteoblastos (Hudson *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 2001) e incluso, células fagocíticas (Gresham *et al.*, 2000; Hébert *et al.*, 2000; Brouillette *et al.*, 2003).

El mecanismo que utiliza *S. aureus* para adherirse a las células consiste en la formación de un puente de fibronectina entre las proteínas de unión a la fibronectina

de la bacteria y las integrinas $\alpha 5\beta 1$ de la célula eucariota (Dziewanowska *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Dziewanowska *et al.*, 2000; Fowler *et al.*, 2000; Massey *et al.*, 2001). Tras la adhesión se desencadenan una serie de señales intracelulares que dan lugar a la polimerización de los microfilamentos de actina de la célula en el punto de contacto con la bacteria, de manera que *S. aureus* es rodeado por pseudópodos e internalizado en un compartimento aislado denominado endosoma (Almeida *et al.*, 1996; Bayles *et al.*, 1998; Jevon *et al.*, 1999).

II.2.2. Toxinas y Enzimas Extracelulares

Staphylococcus aureus produce diferentes exotoxinas que destruyen el tejido y protegen a la bacteria de la respuesta inmune del hospedador (Kerro Deogo *et al.*, 2002).

Las exotoxinas producidas por *S. aureus* pueden dividirse en dos grupos: toxinas con actividad sobre membranas y toxinas con actividad de superantígenos.

II.2.2.1. Toxinas con actividad sobre membranas

Dentro de este grupo se incluyen las toxinas o hemolisinas α , β , γ y δ y la leucocidina. Estas toxinas hemolíticas son antigénicamente diferentes (Bramley *et al.*, 1989).

La α -toxina es citotóxica para una amplia gama de células, entre las que se incluyen eritrocitos, células mononucleares del sistema inmune, células epiteliales, células endoteliales y plaquetas (Bhakdi y Tranum-Jensen, 1991; Bhakdi *et al.*,

1996). Es producida durante el crecimiento de *S. aureus* en el tejido mamario (Cifrian *et al.*, 1995). Esta toxina ejerce su acción citolítica formando poros en las membranas, alterando de esta forma la osmorregulación, el flujo de cationes y otras moléculas, llegando, incluso, a producir apoptosis (Jonas *et al.*, 1994; Menzies y Kourteva, 2000; Bantel *et al.*, 2001).

Por su actividad membranolítica, la α -toxina podría estar implicada, además, en la ruptura del endosoma que engloba a la bacteria tras su internalización en la célula, permitiendo su liberación al citoplasma celular. La mayoría de las cepas de *S. aureus* de origen humano y un 20-50% de las cepas procedentes de IIM en ganado bovino producen esta toxina (Sutra y Poutrel, 1994).

La β toxina, es una esfingomielinasa C. Es producida por el 75 al 100% de las cepas provenientes de IIM bovinas (Sutra y Poutrel, 1994). Esta toxina hidroliza la esfingomielina presente en la membrana plasmática, aumentando la permeabilidad con progresiva pérdida de la carga de la superficie celular (Low y Freer, 1977). Se caracterizan por ser toxinas extracelulares que dañan las membranas de los eritrocitos y otras células de mamíferos mediante la hidrólisis de la esfingomielina, siendo su actividad sobre los eritrocitos la responsable de su carácter hemolítico. La lisis celular que producen se correlaciona con el contenido de esfingomielina (SM) de la membrana, por ello, los eritrocitos de rumiantes, que tienen el porcentaje de SM más alto de todos los mamíferos (51% oveja, 46% vaca y cabra, 27% hombre, 13,5% caballo, 11% perro y 11-13% pequeños roedores), son los más sensibles. Producen una hemólisis típica, denominada “calor-frío”, que consiste en un halo de hemólisis incompleta tras la incubación a 37°C que se hace completa cuando los eritrocitos se enfrían por debajo de 10°C (Coleman *et al.*, 1986). Esta hidrólisis de la

esfingomielina también puede volver a las células más susceptibles a la acción de la alfa toxina (Cifrian *et al.*, 1996). El daño en la esfingomielina lleva a una pérdida rápida de K^+ y a una entrada de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} (Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991). La pérdida de iones causa una ruptura del potencial eléctrico de un lado y otro de la membrana plasmática disminuyendo la carga negativa de la superficie celular. (Darnell *et al.*, 1990). La entrada de Ca^{2+} desencadena una serie de eventos metabólicos intracelulares que llevan a la depleción del ATP. Esto puede afectar la relajación de los filamentos de actina y miosina causando una disfunción en el citoesqueleto y afectando la organización y la movilidad de las proteínas de superficie (Bhakdi y Trantum-Jensen, 1991). Ambas toxinas (alfa y beta), aumentan la adherencia del *S. aureus* a las células epiteliales mamarias (Cifrian *et al.*, 1996). La toxina alfa produce una hemólisis completa en medios de cultivo que contienen sangre (Vadillo *et al.*, 2002). El tiempo exacto en el que se producen estas toxinas durante la multiplicación bacteriana *in vivo* no es bien conocido, pero es probable que se generen en un estadio temprano, cuando las bacterias ingresan dentro del área mamaria.

La γ toxina y la leucocidina, son citolisinas que por su estructura se incluyen en una misma familia de proteínas (leucotoxinas) ya que están compuestas por dos cadenas polipeptídicas denominadas S y F que actúan sinérgicamente para dañar las membranas de las células mediante la formación de poros (Foster y Bohach, 2000). La γ -toxina está presente en casi la totalidad de las cepas de *S. aureus*, ejerce su acción principalmente sobre los eritrocitos y, en menor medida, sobre neutrófilos y macrófagos (Foster y Bohach, 2000). La leucocidina, es una toxina con efecto citolítico sobre los neutrófilos y macrófagos bovinos (Loeffler *et al.*, 1986; Foster y

Bohach, 2000) La mayoría de los aislamientos de *S. aureus*, provenientes de muestras de leche bovina producen leucocidina *in vitro* (Sutra y Poutrel, 1994).

La δ toxina es un polipéptido pequeño (26 aminoácidos), capaz de causar daños en la membrana de una amplia variedad de células (Dinges *et al.*, 2000). Se ha sugerido que la lisis causada por esta toxina es debida a la formación de canales en la membrana (Mellor *et al.*, 1988). La δ -toxina es producida por el 97% de las cepas de *S. aureus*, pero su papel en la patogénesis no se conoce aún aunque se ha descrito que poseen una actividad dermonecrótica, leucotóxica y escasamente letal (Schmitt *et al.*, 1999; Dinges *et al.*, 2000; Herzer, 2001; Said-Salim *et al.*, 2005; Bustos-Martínez *et al.*, 2006).

II.2.2.2. Toxinas con actividad de superantígenos

Este grupo está formado por la familia de toxinas pirogénicas (PTSAgs), compuesta por enterotoxinas y la toxina del síndrome del choque tóxico 1 (TSST-1), y las toxinas exfoliativas (tipos A y B).

Las enterotoxinas son proteínas extracelulares compuestas por una cadena simple de polipéptidos de aproximadamente 30 kDa (Stephan *et al.*, 2001). Aproximadamente el 50% de las cepas de *S. aureus*, produce una o más enterotoxinas (Larsen *et al.*, 2000). Las enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxins –SEs*) pertenecen a un grupo de exotoxinas conocidas como superantígenos toxinas pirogénicas (PTSAgs), entre las cuales se incluyen las secretadas por las especies *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Las toxinas pirogénicas incluyen las SEs serotipos A, B, C_N, D, E, G, H, I, J, K, L, P, toxina-1 del síndrome

del choque tóxico (TSST-1) y las exotoxinas pirogénicas estreptocócicas (SPE A, B, C, F, G, H y J). Estas toxinas muestran algunas estructuras, funciones y secuencias similares entre ellas. Existe evidencia experimental de actividad de superantígenos *in vitro* y/o *in vivo* (Dinges *et al.*, 2000). Las PTSAGs tienen actividad biológica en común: son pirogénicas, causan inmunosupresión y proliferación inespecífica de células T (Dinges *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001). La TSST-1 es pirotógena. Estas toxinas poseen actividad de superantígenos. Se unen como moléculas enteras al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y son capaces de inducir la activación inespecífica de los macrófagos y de las células T, con liberación de citoquinas, y aumentar la susceptibilidad a los lipopolisacáridos bacterianos (Murray *et al.*, 2003; Vadillo *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 2000). Además, pueden tener cierto efecto en la adhesión e invasión, incrementando la patogenicidad de *S. aureus*. (Kerro Dego, 2002). En un estudio que incluyó 262 cepas de *S. aureus* aislados de IIM se demostró que el 20% de las cepas producían esta toxina en asociación con la enterotoxina C y D (Kenny *et al.*, 1993). Estudios de cepas de *S. aureus* aislados de mastitis bovinas clínicas, indicaron que la toxina TSST1 y la enterotoxina C son altamente expresadas por cepas que producen mastitis clínicas hiperagudas (Matsunaga *et al.*, 1993).

Las toxinas epidermolíticas o exfoliativas están implicadas en el síndrome estafilocócico de la piel escaldada (Bailey *et al.*, 1995). Aunque estas toxinas pertenecen al grupo de los superantígenos, su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos T es aproximadamente 100 veces menor que la de las toxinas pirogénicas (Monday *et al.*, 1999). La producción de estas toxinas por cepas

de *S. aureus* aisladas de IIM bovinas es poco frecuente (Akineden *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002).

II.2.2.3. Enzimas extracelulares

Staphylococcus aureus produce numerosas enzimas extracelulares que incluyen: estafiloquinasas, coagulasas, hialuronidasas, lipasas, proteasas, ADNasas termoestables o termonucleasas, catalasas, colagenasas, fosfatasas, elastasas, betalactamasas e hidrolasas ; todas estas se encuentran implicadas en la patogénesis de las IIM bovinas y en las infecciones humanas (Anderson, 1976; Arvidson y Tegmark, 2001).

Entre las enzimas extracelulares se destaca la estafiloquinasa. Esta enzima es un activador del plasminógeno y produce la descomposición de las mallas de fibrina (Kuusela y Saksela, 1990; Christner y Boyle, 1996), con lo que aumenta el potencial invasivo de la bacteria (Lottenberg *et al.*, 1994). Recientemente se ha descrito que la estafiloquinasa es capaz de inducir la secreción de defensinas por los neutrófilos, unirse a ellas y neutralizar su efecto bactericida, contribuyendo a la protección de *S. aureus* frente a las defensas del hospedador (Jin *et al.*, 2004).

El papel concreto jugado en la patogénesis por otras enzimas extracelulares como la coagulasa, la hialuronidasa, las lipasas, las proteasas o la ADNasa no se conoce con exactitud, pero se considera que contribuyen a la capacidad invasiva de *S. aureus* y que podrían estar implicadas en la captación de nutrientes. Asimismo, se ha sugerido que las proteasas podrían participar en la regulación de la virulencia de *S. aureus* degradando las toxinas producidas por la bacteria cuando estas ya no son

necesarias (Lindsay y Foster, 1999), así como en el procesamiento de las enzimas secretadas por *S. aureus* (Shaw *et al.*, 2004).

II.2.3. Regulación genética de los factores de virulencia

La expresión coordinada de los factores de virulencia de *S. aureus* en respuesta a diversas señales medioambientales durante la infección (por ejemplo, expresión de adhesinas al principio, durante la colonización, y producción de toxinas más tarde para facilitar la diseminación tisular) se debe a la existencia de varios reguladores globales que pueden actuar de forma independiente o interaccionar entre sí formando una compleja red de regulación.

Hasta el momento se han descrito dos grandes familias de reguladores globales en *S. aureus*: los sistemas reguladores de dos componentes (TCRS), de los cuales el más conocido es el sistema agr, y la familia de proteínas homólogas a SarA (Arvidson y Tegmark, 2001; Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004). Se ha descrito que SarA promueve la síntesis de las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina, α -, β - y δ -toxinas y *biofilm*, mientras que reprime la de las proteínas de unión a colágeno, proteína A y proteasas uniéndose directamente a los promotores de los genes diana, o indirectamente, por su efecto sobre otros reguladores (Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004).

II.2.4. Regulación genética frente al estrés oxidativo

Los organismos aeróbicos utilizan el O₂ para obtener energía durante su metabolismo, generando continuamente sustancias oxígeno reactivas, como el ión superóxido, el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilo, que poseen un amplio espectro de biotoxicidad dirigido a ADN, ARN, proteínas y lípidos (Cabisco *et al.*, 2000). Cuando la generación de estas sustancias excede la capacidad de defensa del organismo se habla de estrés oxidativo y puede deberse a la acción de diversos agentes medioambientales, como las radiaciones ionizantes o las radiaciones ultravioletas. Asimismo, las células fagocíticas, a través de la enzima NADPH oxidasa, utilizan el estrés oxidativo como una herramienta frente a la invasión de bacterias patógenas (Cabisco *et al.*, 2000).

Los iones metálicos, como el hierro o el manganeso, juegan un papel clave en la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo, ya que actúan como cofactores para las enzimas antioxidantes que poseen (catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa) (Agranoff y Krishna, 1998). El manganeso, además, presenta propiedades antioxidantes por sí solo (Agranoff y Krishna, 1998). Por otro lado, elevadas concentraciones de hierro pueden ser perjudiciales para las bacterias ya que reaccionan con el peróxido de hidrógeno dando lugar a radicales hidroxilo, que son más tóxicos (Cabisco *et al.*, 2000).

La respuesta genética frente al estrés oxidativo se produce en todos los organismos aeróbicos, incluidas las bacterias. En *S. aureus* se han descrito, hasta el momento, cuatro reguladores transcripcionales, PerR, Fur, MntR y Zur, que

responden a niveles de iones metálicos y controlan la expresión de genes necesarios para la resistencia al estrés oxidativo (Cabiscol *et al.*, 2000).

II.2.5. Polisacáridos capsulares

Staphylococcus aureus es un microorganismo que produce enfermedades invasivas, por lo tanto, tiene la capacidad de producir polisacáridos capsulares extracelulares (O'Riordan y Lee, 2004). La cápsula bacteriana es la capa rígida con borde definido formada por una serie de polímeros orgánicos que en las bacterias se deposita en el exterior de su pared celular. Generalmente contiene glicoproteínas y un gran número de polisacáridos diferentes, incluyendo polialcoholes y aminoazúcares (Tauro *et al.*, 1986). Estas cápsulas aumentan la virulencia microbiana por incrementar la resistencia bacteriana a la fagocitosis (O'Riordan y Lee, 2004). El rol de la cápsula en etapas tempranas de la infección, no es claro, aunque se ha informado que el CP 5 podría inhibir la adherencia a las células endoteliales (Pohlmann-Dietze *et al* 2000).

La producción de cápsula por *S. aureus* fue descrita por primera vez en 1931 (Gilbert, 1931). Las cepas fuertemente encapsuladas (tipificadas como cepas M y Smith difusas), producen colonias mucosas, resisten la fagocitosis y son más virulentas para los ratones que las acapsuladas (Cohn, 1962; Koenig, 1962; Melly *et al.*, 1974; Wiley *et al.*, 1974; Wilkinson, 1983).

Karakawa y Vann (1982) reportaron que la mayoría de las cepas de *S. aureus* eran encapsuladas y describieron 8 serotipos capsulares. A las cepas M y Smith difusas, fuertemente encapsuladas les fueron asignados los serotipos 1 y 2,

respectivamente. Las cepas de estos dos serotipos producen colonias mucosas en medios sólidos y son raramente encontradas entre los aislamientos clínicos. Son poco frecuentes en animales, y generalmente aisladas de seres humanos (Arbeit *et al.*, 1984; Hochkeppel *et al.*, 1987; Karakawa *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 1990; Sompolinsky *et al.*, 1985). Posteriormente, se tipificaron varios aislamientos de diferentes fuentes humanas y animales y se incluyeron 3 nuevos serotipos, llegando hasta el 11 (Karakawa *et al.*, 1985; Sompolinsky *et al.*, 1985). Sin embargo, solamente se han aislado y caracterizado químicamente 4 de estos serotipos y no existe evidencia suficiente para concluir que los restantes sean cápsulas o estructuras químicamente distintas de los anteriores (McKenney *et al.*, 2000; O’Riordan y Lee, 2004).

La mayoría de los *Staphylococcus* presentes en el ambiente, están desprovistos de cápsula, pero *S. aureus* aislados directamente de IIM (Sutra y Poutrel, 1990), o de leche, muestran una clara expresión de estructuras superficiales compuestas por carbohidratos (Sandgren *et al.*, 1991), lo cual sugiere que la producción de estos exopolisacáridos es iniciada *in vivo* cuando la bacteria se está multiplicando en la leche (Kerro Dego, 2002).

Staphylococcus aureus produce CP *in vivo* o en condiciones definidas de cultivo (Lee *et al.*, 1993). Los CP confieren propiedades antifagocíticas *in vitro* y se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos hacia ellos favorecen la opsonofagocitosis (Karakawa *et al.*, 1988; Guidry *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1992). En algunos modelos animales experimentales se ha probado claramente la importancia de los CP como factores de virulencia, aunque en otros su rol no se hizo evidente (McKenney *et al.*, 2000).

Los serotipos de CP5 y CP8 son los predominantes en *S. aureus* aislados de infecciones en seres humanos, aunque también fueron aislados a partir de vacas, conejos, cerdos, caballos y gallinas (Poutrel *et al.*, 1993; Guidry *et al.*, 1997; Sordelli *et al.*, 2000; Tollersrud *et al.*, 2000); mientras que los serotipos CP1 y CP2 son de hallazgo infrecuente (Sompolinsky *et al.*, 1985). Los aislamientos de *S. aureus* de rumiantes muestran cierta variabilidad respecto de la distribución de serotipos de CP. En Francia, sobre 212 cepas, el 51% y el 18% fueron clasificadas como serotipos CP5 y CP8 respectivamente (Poutrel *et al.*, 1988). En un estudio que incluyó 636 aislamientos de Suecia, Islandia, Dinamarca, Finlandia y los EE.UU., se determinó que la mayoría de las cepas europeas eran tipificables con antisueros contra los tipos CP5 y CP8, mientras que estos tipos capsulares se encontraron en un 42% de los microorganismos de EE.UU (Tollersrud *et al.*, 2000). Por el contrario, solamente el 17% de 18 aislamientos de mastitis bovina provenientes de Israel fueron tipificables por los sueros contra CP5 y CP8 (Sompolinsky *et al.*, 1985). Las cepas que no reaccionan frente a los anticuerpos para los CP previamente definidos, son considerados como no tipificables (NT) (Arbeit *et al.*, 1984; Sompolinsky *et al.*, 1985; Hochkeppel *et al.*, 1987).

Estudios recientes demostraron que muchas cepas NT pueden tener la capacidad genética para producir los CP (Tollersrud *et al.*, 2000). De 195 cepas de *S. aureus* aisladas de mastitis bovina en Argentina, se determinó que solo el 14% eran tipificables con antisueros contra CP5 y CP8; mientras que sobre 8 cepas NT, 3 poseían los genes responsables de la síntesis de los tipos de CP5 y CP8. De estos aislamientos, sólo el 4,6% del total pertenecía a la cuenca lechera central, mientras

que el 73% provenían de otras cuencas y de la provincia de Buenos Aires (Sordelli *et al.*, 2000).

II.2.5.1 Bioquímica capsular

Las cápsulas o micro cápsulas estudiadas de cepas de *S. aureus* han sido descritas y parcialmente caracterizadas (Wilkinson, 1983). Éstas contienen ácidos hexosaminurónicos. La caracterización bioquímica de polisacáridos purificados ha sido realizada solo de 4 de los 11 tipos capsulares. La cepa M expresa el tipo capsular 1, el tipo 5 y 8 difieren solamente en el lugar de unión entre los azúcares y en el sitio de acetilación de los residuos del ácido manosaminurónico. La estructura del CP4 nunca fue dilucidada, aunque un serotipo CP4 de la cepa 7007 ha mostrado reacción con anticuerpos para CP5 (Vann *et al.*, 1988).

II.2.5.2 Serotipos capsulares 1 y 2

Estos serotipos impiden la muerte bacteriana por fagocitosis. Se ha demostrado que cepas de los serotipos 1 y 2 resisten *in vitro* la opsonofagocitosis por leucocitos humanos. El complemento y los anticuerpos dirigidos hacia los componentes de la pared celular de *S. aureus* son depositados en la pared bacteriana debajo de la capa capsular (Verbrugh *et al.*, 1982; Wilkinson, 1983). La cápsula impide la interacción entre el complemento o la inmunoglobulina con los receptores para esa molécula en las células fagocíticas. Como resultado la bacteria evade la fagocitosis. En presencia de anticuerpos específicos para la cápsula, el C3b y los anticuerpos son depositados a

lo largo de la matriz capsular y sobre la superficie bacteriana, haciéndolas disponibles para el reconocimiento por parte de los receptores de los fagocitos (Verbrugh *et al.*, 1981; Arizono *et al.*, 1991).

II.2.5.3 Rol de las cápsulas tipo 1 y 2 en la virulencia

Cuando se inocularon por vía intraperitoneal en ratones cepas encapsuladas tipo 1 y 2 de *S. aureus*, mostraron más virulencia que cepas no mucoides. Las cepas mucoides no son efectivamente fagocitadas dentro de la cavidad peritoneal y así puede este microorganismo replicarse en forma extracelular libremente. La multiplicación de los estafilococos es acompañada por la producción de toxina α , resultando letal dentro de las 24 a 48 horas del ingreso de la bacteria (Koenig, 1962).

II.2.5.4 Polisacáridos capsulares tipo 5 y 8

La mayoría de los aislamientos clínicos de *S. aureus* producen tipos capsulares 5 y 8. Las colonias de los serotipos 5 y 8 no son mucoides y la morfología de las colonias es indistinguible de las cepas acapsuladas. Las colonias de los estafilococos productores de CP5 y CP8 son usualmente descritas como micro encapsuladas. Esta terminología es usada para distinguir estos aislamientos de las cepas mucosas tipo 1 y 2 (Albus *et al.*, 1991).

II.2.5.5. Producción de cápsula *in vitro*

La expresión de CP5 y CP8 es altamente sensible a varias señales del entorno y probablemente influenciada por el ambiente. Las condiciones de crecimiento bacteriano, tal como el medio de cultivo, han demostrado tener una influencia muy importante en la producción de polisacáridos capsulares (Dassy *et al.*, 1991; Poutrel *et al.*, 1995).

El crecimiento de *S. aureus* bajo concentraciones limitantes de Fe y en medio sólido aumenta la producción de CP8 (Lee *et al.*, 1993). El incremento en la producción del tipo capsular 5 fue observado bajo condiciones de elevada tensión de oxígeno, pero se redujo bajo condiciones alcalinas de crecimiento o en presencia de extracto de levadura (Stringfellow *et al.*, 1991; Dassy *et al.*, 1991; Herbert *et al.*, 1997). La producción de cápsula *in vitro* se incrementa con el crecimiento de las bacterias en leche (Sutra *et al.*, 1990) o en medios suplementados con un 5% de CINa (Pohlmann-Dietze *et al.*, 2000). La producción de CP no se vio afectada por cambios en el contenido de fosfatos en el medio (Fox *et al.*, 1998). Una pequeña cantidad de cápsula es producida en la fase logarítmica de crecimiento mientras que la máxima producción ocurre durante el período post exponencial de la fase de crecimiento (Poutrel *et al.*, 1995; Dassy y Fournier, 1996; Pohlmann-Dietze *et al.*, 2000; Cunnion *et al.*, 2001).

Se ha determinado que el CO₂ regula la expresión del CP5 tanto *in vivo* como *in vitro* (Herbert *et al.*, 1997). Aunque CP5 fue expresado bajo condiciones normales de oxígeno, la expresión de éste por 3 diferentes cepas serotipo 5 fue inhibida cuando se cultivaron en atmósfera suplementada con 1 a 5 % de CO₂ (Herbert *et al.*, 1997,

Herbert *et al.*, 2001). El CO₂ mostró afectar la expresión del gen *cap5* a nivel transcripcional (Herbert *et al.*, 2001). En contraste, la detección cuantitativa del CP8 en diferentes cepas de *S. aureus* cultivadas en presencia de CO₂ dio resultados conflictivos; algunas cepas desarrollaron mientras que otras se vieron inhibidas (Herbert *et al.*, 2001).

II.2.5.6 Producción de cápsula *in vivo*

Varios estudios han demostrado en sueros de animales con diferentes patologías estafilococales la producción tanto de CP5 como de CP8 (Arbeit *et al.*, 1987; Arbeit y Nelles, 1987), aunque fue mínima la expresión de CP5 observada en patologías del tejido pulmonar, esto tal vez este correlacionado con los elevados niveles de CO₂, el cual ha mostrado ser un factor que disminuye su expresión (Herbert *et al.*, 1997; Herbert *et al.*, 2001). Además, utilizando una cepa productora de CP5, se pudo detectar su presencia *in vivo* en infecciones mamarias experimentales agudas y crónicas (Hensen *et al.*, 2000).

II.3. Slime y biofilm

Otra característica observada en cepas de *S. aureus* es la capacidad de formar *slime*. Este es un exopolisacárido que puede perderse fácilmente con los lavados (Baselga *et al.*, 1994) y es un rasgo característico que permite el agrupamiento de las bacterias dentro de microcolonias (Costerton *et al.*, 1999), como así también le brinda la capacidad de formar *biofilms*. Los *biofilms* se definen como comunidades

de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos producida por las bacterias y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton *et al.*, 1995). El componente mayoritario del *biofilm* es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total (Sutherland *et al.*, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda *et al.*, 2005). Las estructuras que forman estas microcolonias contienen canales por los que circulan los nutrientes, agua y oxígeno, incluso hasta las zonas más profundas del *biofilm*. En las distintas partes del *biofilm* las células expresan diferentes genes, como si fueran un tejido organizado (Davey y O'Toole, 2000).

La producción de *slime* por *S. aureus* se demostró por la morfología rugosa de las colonias en el agar rojo congo y la capacidad de la bacteria de producir *biofilm* en la pared del tubo. El serotipo 5 produce este tipo de colonia rugosa (Baselga *et al.*, 1994). La producción de *slime* es considerada un factor significativo de virulencia para algunas cepas de *Staphylococcus* (Christensen *et al.*, 1982; Davenport *et al.*, 1986; Mack *et al.*, 2000). Esta estructura polisacáridica extracapsular y lábil confiere a las cepas que lo producen una elevada capacidad de adhesión y colonización si se comparan con las cepas que no lo producen. Por lo tanto, el *slime* puede jugar un rol importante en el establecimiento de la infección (Baselga *et al.*, 1993; Ammendolia *et al.*, 1999). La producción de *slime* también está asociada a una reducción de la susceptibilidad a los antibióticos (Kloss y Bannerman, 1994).

La producción de *slime* depende de la cepa. Cepas *slime* negativas a partir de cepas originalmente *slime* positivas y viceversa, se encuentran en casos agudos y crónicos de enfermedades estafilococales. Variantes de *slime* negativas pueden

separarse del *biofilm* y diseminarse a nuevos sitios de infección. En estos sitios pueden volver a producir *slime* (Kerro Dego *et al.*, 2002). Además, estas microcolonias no son susceptibles a la fagocitosis por los neutrófilos dada su extensión y la formación de reacciones inflamatorias humorales y celulares. Estas reacciones usualmente son suficientes para eliminar las bacterias individuales que se desprenden de la superficie (Baselga *et al.*, 1994). Este tipo de agrupación, también dificulta la acción de los antibióticos porque no permite el acceso (no alcanzan concentraciones inhibitorias) o porque las bacterias latentes dentro de las microcolonias pueden ser menos sensibles a los mismos, debido a su menor actividad metabólica dentro del *biofilm* (Amorena *et al.*, 1999; Baselga *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1999). Estos exopolisacáridos extracelulares pueden servir como receptores primarios para la adhesión o ser producidos después que la bacteria se ha adherido (Kerro Dego *et al.*, 2002). Se comprobó que las cepas productoras de *slime* tuvieron una capacidad de colonizar significativamente más alta que las variantes de las cepas que no los producían (Arslan y Özkardes, 2007). La capacidad de formar *biofilm* ayuda a la bacteria a sobrevivir en un ambiente hostil dentro del hospedador, evitando la fagocitosis y por lo tanto se considera que puede jugar un rol en las infecciones persistentes o crónicas (Baselga *et al.*, 1993; Costerton, 1999; Kerro Dego *et al.*, 2002).

La adhesión de *S. aureus* al epitelio de la glándula mamaria es considerado el primer paso crítico en la patogénesis de la mastitis. La mayoría de las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis están rodeadas por una capa de *slime*, la cual ayuda al microorganismo a adherirse y colonizar el epitelio glandular (Vasudevan *et al.*, 2003), jugando un rol importante en el establecimiento de la infección (Baselga *et*

al., 1993, Ammendolia *et al.*, 1999). La habilidad de *S. aureus* de formar *biofilm in vivo* es considerada el mayor factor de virulencia que tiene influencia en la patogénesis de las mastitis, ya que al desarrollarse sobre el epitelio glandular mamario, dificulta la llegada de la respuesta inmune y la acción de los antibióticos (Baselga *et al.*, 1993; Úbeda *et al.*, 2002).

II.3.1. Formación del *biofilm*

La etapa inicial del proceso de formación del *biofilm* es la adherencia sobre las superficies (Lasa *et al.*, 2005). Cuando las bacterias colonizan tejidos vivos, utilizan mecanismos de adhesión para evitar ser eliminadas. En la adherencia inicial a los epitelios normalmente participan adhesinas. Estas adhesinas y fimbrias son peligrosas para la bacteria porque su adhesividad hace que sean fácilmente reconocidas por los fagocitos circulantes y, por ello, rápidamente eliminadas (Costerton, 1999). En el caso de las bacterias Gram positivas, se han descrito proteínas de superficie denominadas MSCRAMM (componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz), capaces de reconocer específicamente proteínas del hospedador, entre las que se destacan: fibrinógeno, fibrina y fibronectina, en esta primera etapa de adherencia primaria (Foster y Höök, 1998; Cucarella *et al.*, 2001). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando microcolonias (Lasa *et al.*, 2005). En una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del *biofilm* y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del *biofilm* se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo del *biofilm*. La liberación de las bacterias desde el *biofilm* es el proceso que menos se conoce. En el caso de *S. aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase, fenómeno en el que algunas bacterias dejan de expresar unos determinados genes, que es producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón (*icaADBC*) responsable de la síntesis del exopolisacárido del *biofilm* (Lasa *et al.*, 2005). El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población, y produce bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación de *biofilm*. Esto le permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y poder escapar del *biofilm* (Cramton *et al.*, 1999).

Se ha descrito además, la presencia del gen *bap* (*protein biofilm-associated*) (Cucarella *et al.*, 2001), el cual está implicado en la formación del *biofilm*. Este gen presenta variación de fase en su expresión, pudiéndose encontrar bacterias que de forma reversible son capaces o no de expresarlo. Esta variación de fase regula el proceso infectivo de *S. aureus*, ya que la expresión de la proteína conduce a la formación del *biofilm* y al bloqueo de las adhesinas de superficie de la bacteria, facilitando la persistencia pero dificultando la colonización a nuevos tejidos (Úbeda *et al.*, 2002). Por otro lado, la ausencia en la expresión de *bap* facilita que la bacteria abandone el *biofilm* y colonice nuevas regiones de la mama, en donde podrían volver a formar *biofilm* gracias a la reversibilidad en la expresión de este gen o dar lugar a episodios infectivos agudos (Úbeda *et al.*, 2002). Esta regulación por variación de fase, representa una importante ventaja para la supervivencia de las especies

bacterianas, ya que permite mantener al mismo tiempo subpoblaciones con distinto comportamiento capaces de responder de manera adecuada e inmediata a la variación de las condiciones del medio (Úbeda *et al.*, 2002). Otra alternativa descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del *biofilm* debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para el proceso de formación de *biofilm* (Úbeda *et al.*, 2003).

Es importante resaltar que estos exopolisacáridos son diferentes a los exopolisacáridos capsulares, en su naturaleza tanto química como física (Mc Kenney, 1998). La microcolonia sigue creciendo en volumen y las bacterias que están cerca del epitelio tienen un acceso difícil a los nutrientes del medio externo. Sólo aquellas localizadas en las capas superiores continúan multiplicándose, situación que crea poblaciones bacterianas con diferencias en su metabolismo (Rimbaud y Lorenzo, 2004).

Las bacterias individualizadas en el medio externo son fagocitadas con facilidad por las células inflamatorias que rodean a la microcolonia y son susceptibles a los antibióticos. La microcolonia provoca la aparición de una respuesta inmune, aunque su tamaño es demasiado grande como para ser fagocitada. Es más, la liberación de enzimas de los fagocitos que rodean la colonia puede producir daños en los tejidos alrededor del *biofilm*, lo que favorecerá el crecimiento del mismo (Lasa *et al.*, 2005). Por otro lado, las bacterias englobadas en los *biofilms* son extremadamente resistentes a los tratamientos antibióticos. Esta resistencia puede explicarse por 3 hipótesis que no son necesariamente excluyentes (Costerton, 1999; Gracia, 1999):

- 1- Aunque los antibióticos pueden penetrar en el *biofilm*, no alcanzan una concentración suficiente en algunas partes del mismo.

2- Las bacterias situadas en la base del *biofilm* son metabólicamente inactivas, debido a la limitación de nutrientes y por ello resistentes a algunos antibióticos.

3- Existen mecanismos de degradación activa de los antibióticos que evitan que en algunas partes del *biofilm* se alcancen concentraciones efectivas (Mah y O'Toole, 2001).

En cualquier caso, la práctica demuestra que en los procesos crónicos mediados por biofilms los tratamientos antibióticos no pueden eliminar la infección. Por ejemplo, en las mastitis crónicas por *S. aureus* de rumiantes o conejos, en general se asume que el tratamiento antibiótico tendrá una muy baja eficacia (Lasa *et al.*, 2005).

En la vida del animal se producen con frecuencia situaciones estresantes que pueden dar lugar a una inmunodepresión generalizada. En esos momentos, las bacterias que se individualizan pueden superar la barrera inflamatoria y extenderse a otros tejidos. De hecho, la continua aparición de estos brotes agudos es lo que caracteriza a los procesos crónicos. Por ejemplo, en las mastitis crónicas por *S. aureus* es sintomático ver que un animal presenta brotes agudos cada pocas semanas o meses, sin curarse nunca. Estas patologías agudas se solucionan puntualmente con un tratamiento antibiótico, incluso a veces por sí solas, pero no así los procesos crónicos. Una estrategia para controlarlas y prevenirlas podría ser la utilización de los exopolisacáridos del *biofilm* como antígenos vacunales. Se especula que de este modo se podría evitar la aparición de problemas crónicos en la explotación (Rimbaud y Lorenzo, 2004).

II.4. Aspectos de la respuesta inmune de la glándula mamaria bovina

II.4.1. Susceptibilidad a infecciones

La glándula mamaria es un órgano complejo. La incidencia de mastitis aumenta cuando se dañan los mecanismos de defensa de la glándula mamaria. El ganado de los sistemas productivos lecheros se expone a numerosos factores genéticos, fisiológicos y medioambientales que pueden comprometer la inmunidad del hospedador y aumentar la incidencia de mastitis (Hopster *et al.*, 1998; Persson-Waller, 2000; Sordillo *et al.*, 2002). En los últimos años, el énfasis en la selección genética para maximizar la producción de leche ha aumentado el estrés metabólico asociado con la síntesis y secreción de leche, existiendo una correlación negativa entre la capacidad de producción láctea y la resistencia a la mastitis (Detilleux *et al.*, 1995).

Al finalizar la lactancia, la involución normal de la glándula mamaria bovina, en lo que se denomina etapa de vaca seca, es de fundamental importancia para asegurar una máxima producción de leche durante la lactancia siguiente (Sorensen y Enevoldsen, 1991). Durante el período no lactante se originan IIM que pueden reducir la producción láctea hasta en un 30% comparando con cuartos mamarios no infectados (Sordillo y Nickerson, 1988; Sordillo *et al.*, 1989). Además, las IIM contraídas durante la involución están frecuentemente asociadas con la aparición de mastitis clínicas durante la lactancia temprana y pueden tener un efecto perjudicial en la calidad y producción de leche. La susceptibilidad de la glándula mamaria bovina a las nuevas IIM aumenta marcadamente durante la involución temprana y durante el

periparto (Oliver y Sordillo, 1989). Durante la involución temprana de la glándula mamaria comienzan a aumentar significativamente algunas proteínas defensivas, como la lactoferrina e inmunoglobulinas, así como células del sistema inmune; sin embargo, la aparición de nuevas infecciones intramamarias se ve favorecida en esta etapa (Oliver y Mitchel, 1983). Esto se debe fundamentalmente al gran volumen de leche acumulado, la falta de remoción de la leche y la escasa concentración de los sistemas defensivos durante los primeros días de este período (Oliver y Sordillo, 1989). Durante el periparto, el estrés producido por la preñez y el parto estimula la producción de una variedad de hormonas que tienen importantes efectos sobre la respuesta inmune. Un grupo de estas hormonas de estrés que regulan la función inmune son conocidas como corticoesteroides. La síntesis de glucocorticoides (dexametasona) puede disminuir el número, la distribución y función de los leucocitos en sangre bovina (Persson-Waller, 2000). Estos hechos determinan la necesidad de implementar medidas de control durante el período seco a los efectos de disminuir al máximo la presencia de IIM al parto.

La defensa de la glándula mamaria contra los patógenos causantes de mastitis es mediada tanto por factores anatómicos como celulares. Una vez que el microorganismo atravesó el canal del pezón, es la eficiencia de estos mecanismos de defensa los que determinan que se instale o no una nueva IIM (Sordillo *et al.*, 1997).

II.4.2. Inmunidad glandular

La glándula mamaria está protegida por diversos mecanismos defensivos, los cuales pueden ser separados en dos categorías diferentes: la inmunidad innata y la inmunidad específica o adaptativa. La primera es la que predomina durante los primeros estadios de la infección, es inmediata, inespecífica y no tiene memoria. Este tipo de defensa está presente o se hace activa rápidamente en el sitio de la infección por numerosos estímulos, aunque no aumenta frente a las repetidas exposiciones al mismo antígeno. Si este mecanismo defensivo funciona adecuadamente la mayoría de los patógenos son eliminados rápidamente (Sordillo y Streicher, 2002).

La respuesta innata está mediada por la barrera física que se encuentra en el conducto del pezón, así como por macrófagos, neutrófilos, células NK (*natural killer*) y ciertos factores solubles (Sordillo y Streicher, 2002). Si el agente patógeno es capaz de evadir o no es completamente eliminado por el sistema defensivo innato, se desencadena la segunda respuesta inmune adaptativa o específica, que reconoce determinantes antigénicos específicos de los patógenos, lo que favorece su eliminación selectiva. El reconocimiento de estos factores patogénicos, está mediado por anticuerpos, macrófagos y algunas poblaciones de linfocitos. Gracias a la memoria inmunológica de ciertos linfocitos, este tipo de inmunidad, aumenta frente a las sucesivas exposiciones a los agentes patógenos (Sordillo y Streicher, 2002). En comparación con la primera exposición al agente bacteriano, la respuesta a la segunda exposición es mucho más rápida, fuerte y duradera, y frecuentemente más efectiva para eliminar el patógeno (Tizard, 2002).

El sistema inmune es capaz de distinguir lo propio de lo no propio y selectivamente reaccionar solo para antígenos extraños a través de proteínas unidas a membrana genéticamente diversas, llamadas complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La respuesta inmune específica solo puede ocurrir si los antígenos se combinan con moléculas del CMH en la superficie de ciertas células, un proceso conocido como presentación de antígenos. El reconocimiento de factores patogénicos para su eliminación posterior está mediado por macrófagos, ciertas poblaciones linfocíticas e inmunoglobulinas o anticuerpos (Monks *et al.*, 2002; Sordillo y Streicher, 2002; Beutler, 2004). En la glándula mamaria son necesarias ambas respuestas inmunes, tanto la innata como la adaptativa, las cuales deben actuar en forma coordinada para proveer una óptima protección contra los microorganismos causantes de mastitis (Sordillo y Streicher, 2002).

Los microorganismos expresan patrones moleculares que son específicos y rápidamente diferenciables de los del hospedero; estos incluyen por ejemplo, ADN bacteriano, ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram positivas y lipopolisacáridos (LPS), de bacterias Gram negativas (Texeira *et al.*, 2002).

El sistema inmunitario ha desarrollado diferentes métodos para discriminar moléculas propias de moléculas extrañas. La estrategia de reconocimiento microbiano se basa en la detección de patrones moleculares conservados que son productos esenciales de la fisiología microbiana (Janeway Jr. 1989). Actualmente dichas estructuras invariantes son conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), los cuales son expresados únicamente por microbios, son relativamente conservados en microorganismos similares y su expresión es esencial para la sobrevivencia del microorganismo (Texeira *et al.*, 2002). Dos PMAP comunes

son el LPS y el peptidoglicano (PGN) de las bacterias Gram positivas. Estos PMAP son reconocidos por receptores del sistema inmunitario innato denominados receptores de reconocimiento de patrones (RRP), lo cual propicia la inducción de una respuesta inmunitaria (Medzhitov, 2001).

Los receptores tipo Toll (TLR), comprenden la clase de RRP expresados en la superficie celular, activan vías de señalización que inducen respuestas efectoras antimicrobianas y de inflamación al reconocer los PMAP. La activación de los TLR expresados en células presentadoras de antígenos (CPA) especializadas como las células dendríticas, desempeñan un papel crucial en la iniciación de respuestas inmunitarias adaptativas actuando como nexo entre la respuesta inmune innata y adquirida (Heine, 2003; Rainard y Riollet, 2006). La activación de los TLR de una CPA provoca que esta célula exprese péptidos antigénicos sobre su superficie celular, que están unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y activan células T específicas de antígeno (Heine, 2003).

La activación de los TLR propicia no sólo la inducción de respuestas inflamatorias, también provoca una respuesta adaptativa antígeno-específica (Takeda *et al.*, 2003). Un total de 13 diferentes TLR se han descrito en ratones y seres humanos (Kaisho y Akira, 2006). En bovinos, en los últimos años, se han descrito las secuencias de 10 TLRs (Werling *et al.*, 2006). La participación de TLR2 ha sido implicada en la respuesta inmune del hospedador en varios modelos de infección estafilocócica, jugando un importante rol como receptor de la inmunidad innata (Takeuchi *et al.*, 2000).

II.4.3. Defensas anatómicas

La mastitis puede ocurrir cuando las bacterias ascienden vía canal del pezón hacia la glándula mamaria. Por esta razón, la punta del pezón es considerada la primera línea de defensa contra la invasión de los patógenos, gracias a su estructura, conformada por músculo espiralado que mantiene el orificio del pezón cerrado entre los ordeños, impidiendo así el ingreso de las bacterias. El canal del pezón también está cubierto con queratina la que actúa en el mantenimiento de la funcionalidad de esta barrera. La queratina del pezón es un material de aspecto ceroso que deriva del epitelio escamoso estratificado. La remoción de esta capa ha sido correlacionada con un incremento en la susceptibilidad a la invasión y colonización bacteriana (Bramley y Dodd, 1994; Capuco *et al.*, 1992). Esta estructura de queratina, permite bloquear el ingreso de bacterias, y de este modo impedir que migren hacia la cisterna glandular (Hibbit *et al.*, 1969). Además, han sido identificados algunos agentes antimicrobianos dentro de esta estructura proteica, como son los ácidos grasos, tanto el ácido mirístico, palmitoleico y linoleico, los cuales cumplirían funciones bacteriostáticas (Treece *et al.*, 1966). También se encuentran proteínas catiónicas asociadas con el revestimiento de queratina, las cuales alteran las paredes bacterianas, haciéndolas más susceptibles a la presión osmótica del medio y por lo tanto, a la lisis celular (Treece *et al.*, 1966).

En el periparto, ocurre una considerable acumulación de fluidos dentro de la glándula mamaria, causando un incremento de la presión intramamaria (Sordillo *et al.*, 1987; Oliver y Sordillo, 1988). La misma es especialmente susceptible a la

mastitis durante este momento, parcialmente debido a la dilatación del canal del pezón y filtración de las secreciones mamarias.

II.4.4. Defensas celulares

Si las bacterias patógenas son capaces de atravesar el orificio del pezón, deben escapar de la actividad antibacteriana del microambiente de la glándula mamaria para poder establecer la infección. Las células somáticas de la leche incluyen neutrófilos, macrófagos, linfocitos y un pequeño porcentaje de células epiteliales. Estos tipos celulares aumentan rápida y notablemente después del establecimiento de la infección intramamaria (Paape *et al.*, 1981).

Varios estudios han demostrado que la severidad y la duración de las mastitis esta críticamente relacionado con la rapidez de migración de los linfocitos y la actividad bactericida de las células somáticas en el sitio de la infección (Grommers *et al.*, 1989; Paape *et al.*, 2002). El número total y actividad de los leucocitos en la glándula mamaria juegan un rol vital en la determinación de la severidad y duración de las IIM (Sordillo y Streicher., 2002).

Los neutrófilos son leucocitos no específicos que son activamente reclutados hacia el sitio de infección. Constituyen el principal tipo celular encontrado en el tejido mamario y secreción durante el período temprano del proceso inflamatorio asociado con infección bacteriana (Paape *et al.*, 2000). Aunque el número de neutrófilos es relativamente bajo en la glándula mamaria sana ($<10^5$ cél/ml), su número puede constituir un porcentaje mayor al 90% del total de la población leucocitaria durante la mastitis ($>10^6$ cél/mL). Estas células no específicas migran de

la sangre a la glándula mamaria en respuesta a una variedad de mediadores inflamatorios con la finalidad de fagocitar y eliminar al patógeno bacteriano (Persson *et al.*, 1993). Los neutrófilos poseen efectos bactericidas que son mediados a través de la producción de radicales libres de oxígeno e hidroxilo (Heyneman y Burvenich, 1992). En adición, los neutrófilos son fuente de pequeños péptidos antibacterianos, defensinas, que pueden eliminar a una variedad de patógenos causantes de mastitis (Selsted *et al.*, 1993). En la **Tabla 2** se resumen las defensas celulares de la glándula mamaria bovina.

Algunas bacterias liberan productos metabólicos, como enterotoxinas o componentes de la pared celular para colonizar y crecer en la glándula mamaria. Estos productos a su vez actúan como quimiotácticos para leucocitos. Si las células somáticas migran rápidamente desde la circulación y son capaces de eliminar a las bacterias, el reclutamiento de linfocitos cesa y los RCS retornan a sus valores normales. Si las bacterias son capaces de sobrevivir a esta rápida respuesta del hospedador, la inflamación continúa y la migración de células continúa hacia el lumen alveolar (Capuco *et al.*, 1986). La prolongada diapédesis de leucocitos causa daño al parénquima mamario, resultando en una disminución en la producción de leche (Harmon y Helad, 1982; Sordillo y Nickerson, 1988).

Durante el parto, la función de un número de neutrófilos está disminuida o alterada (Kehrli *et al.*, 1989; Heyneman y Burvenich, 1992; Cai *et al.*, 1994; Zecconi *et al.*, 1994). En ese momento, el número de neutrófilos inmaduros en sangre bovina se incrementa, mientras que el número de neutrófilos maduros en sangre y secreción mamaria es menor. Alrededor del parto, la población de neutrófilos también exhibe función disminuida en actividades relacionadas con la defensa como fagocitosis,

producción de aniones superóxido, migración celular y quimiotaxis (Kehrli *et al.*, 1989). Esta última actividad puede estar alterada debido a la proporción disminuida de células que expresan el receptor de adhesión CD62L (L-selectina) que es necesario para la penetración a través del endotelio al sitio de infección (Lee y Kehrli, 1998). Una depleción de neutrófilos resulta en un dramático incremento de la susceptibilidad a las IIM (Schalm *et al.*, 1976).

Factor	Función biológica
Neutrófilos	Fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, secreción de factores antibacterianos.
Macrófagos	Fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, presentación de antígenos en conjunto con CMH.
Células NK	Linfocitos no inmunes que cuando son activados secretan proteínas antibacterianas.
Linfocitos T	
CD4 + (linfocitos T helper)	Producción de citoquinas inmunoregulatorias seguido de reconocimiento antigénico con moléculas del CMH clase II; células de memoria seguido de reconocimiento antigénico.
CD8 + (linfocitos T citotóxicos)	Lisis de células alteradas o dañadas del hospedador en conjunto con moléculas de CMH clase I; producción de citoquinas que pueden regular negativamente ciertas funciones leucocitarias.
Linfocitos T $\gamma\delta$	Las funciones biológicas en la glándula mamaria son especulativas

Linfocitos B	
Células B maduras	Exponen moléculas de anticuerpos unidos a membrana que facilitan la presentación antigénica; células de memoria después de la interacción antigénica
Células plasmáticas	Proviene de linfocitos B diferenciados que sintetizan y secretan anticuerpos contra antígenos específicos.

Tabla 2: Resumen de las defensas celulares de la glándula mamaria (adaptado de Sordillo y Streicher, 2002).

El estímulo del amamantamiento u ordeño induce migración directa de nuevos neutrófilos dentro del tejido mamario (Paape *et al.*, 1992). De este modo, la glándula mamaria estéril está abastecida con una fuente constante de neutrófilos. Sin embargo, una vez en la luz de los alvéolos, la ingestión de caseína y grasa causa una pérdida de las funciones fagocíticas y bactericidas y lleva a la muerte de los neutrófilos (Paape y Wergin, 1977). El ordeño remueve los neutrófilos comprometidos, los cuales son reemplazados por nuevos neutrófilos, reforzando las defensas contra las infecciones bacterianas. Este fenómeno podría explicar parcialmente la reducida incidencia de mastitis clínicas en vacas ordeñadas cuatro veces por día comparadas con vacas ordeñadas dos veces por día (Hillerton y Walton, 1991).

Paape *et al.* (1996) demostraron que los neutrófilos bovinos poseen la capacidad de unirse a anticuerpos monoclonales anti CD14 y CD18 humanos, indicando que los CD14 y 18 en neutrófilos humanos y bovinos comparten un determinante antigénico común. Estos receptores celulares de superficie en leucocitos han sido identificados como cruciales para el control de las infecciones por bacterias Gram negativas

(Anderson y Springer, 1987; Maliszewski y Wright, 1991). El receptor de CD14 es una proteína de 53 kDa que está presente en monocitos y macrófagos humanos y en menor medida en neutrófilos (Landmann *et al.*, 1991). Esta proteína anclada en la membrana facilita el clearance de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos previniendo el shock séptico inducido por éste (Lee *et al.*, 2003). Además, produce una señal de activación en las células epiteliales mamarias para que expresen IL-8 (Wang *et al.*, 2002).

Los macrófagos representan el tipo celular dominante en leche y tejido mamario sano durante la lactancia. En la patogénesis bacteriana, los macrófagos pueden facilitar la respuesta inmune innata o adquirida. De forma similar a los neutrófilos, las funciones no específicas de los macrófagos son fagocitar las bacterias y destruirlas con proteasas y especies reactivas de oxígeno. La tasa de fagocitosis de estas células puede incrementarse dramáticamente en presencia de anticuerpos opsonizados contra patógenos particulares (Miller *et al.*, 1988; Magnusson, 1999). Sin embargo, el número de macrófagos mamarios tiende a ser bajo durante la inflamación y poseen bajo número de receptores Fc (Niemiłowski *et al.*, 1988). La habilidad de los macrófagos para secretar sustancias que faciliten la migración y actividad bactericida de los neutrófilos se cree que es de gran importancia en las defensas no específicas de la glándula mamaria. Los macrófagos activos disparan la liberación de prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas que pueden aumentar el proceso inflamatorio local (Persson-Waller *et al.*, 1993; Van Kampen y Mallard, 1997; Kehrli *et al.*, 1999). Los macrófagos también juegan un rol en el desarrollo de la respuesta inmune específica a través del procesamiento y presentación de

antígenos en asociación con el CMH clase II (Fitzpatrick *et al.*, 1992; Politis *et al.*, 1992).

Una alteración dramática de las capacidades funcionales de los macrófagos ocurre durante el parto y ha sido directamente relacionada con la incidencia de enfermedad. Aunque el número de macrófagos bovinos es alto en la última semana de gestación, la capacidad fagocítica de estas células decrece, posiblemente debido a la baja actividad opsonina en secreción mamaria. Esta actividad reducida puede estar mediada por una disminución en la Ig M, la cual facilita la fagocitosis tanto para los neutrófilos como para los macrófagos (Persson-Waller, 2000). Adicionalmente, la expresión de CMH clase II por los macrófagos bovinos durante el parto disminuye, lo cual podría contribuir a una pobre presentación de antígenos y como resultado una débil respuesta inmune específica de los linfocitos de la glándula mamaria (Fitzpatrick *et al.*, 1992; Mallard *et al.*, 1998).

Los linfocitos son capaces de reconocer antígenos a través de receptores específicos de membrana lo cual define las características inmunológicas de especificidad, diversidad, memoria y capacidad de reconocimiento de lo propio y no propio. Los linfocitos se dividen en dos grupos principales: linfocitos T y B. Los linfocitos T pueden ser clasificados como $\alpha\beta$ -T linfocitos, que incluye a los CD4+ (linfocitos T *helper*) y CD8+ (T citotóxicos o T supresores) y células T $\gamma\delta$. En glándula mamaria sana de humanos, porcinos y bovinos predominan los $\alpha\beta$ -T linfocitos y expresan el fenotipo CD8+ fundamentalmente, en contraste con sangre periférica que expresan primariamente el fenotipo CD4+ (Shafer-Weaver *et al.*, 1996; Asai *et al.*, 1998; Wagstrom *et al.*, 2000). Las células linfocíticas en leche humana y bovina también muestran un fenotipo de células de memoria (Bertotto *et*

al., 1990; Taylor *et al.*, 1994). Sin embargo, en glándula mamaria de caprinos, los linfocitos CD4⁺ son el tipo celular predominante durante toda la lactancia (Ismail *et al.*, 1996). Dependiendo del estadio de la lactancia y de la localización en el tejido, el porcentaje de cada subconjunto de linfocitos puede variar significativamente. Un mayor cambio en el modelo de tráfico se correlaciona con mayor susceptibilidad a las enfermedades (Park *et al.*, 1992; Shafer-Weaver *et al.*, 1996; Van Kampen y Mallard, 1997).

Durante la mastitis, prevalecen los linfocitos CD4⁺ y son activados en respuesta al reconocimiento de los antígenos del CMH clase II y células presentadoras de antígenos, como células B o macrófagos. Estas células funcionan para activar linfocitos y macrófagos por su habilidad de secretar ciertas citoquinas. Dependiendo del repertorio de citoquinas producidas, la respuesta de las células T *helper* puede facilitar tanto la respuesta inmune mediada por células (tipo Th1) o la respuesta inmune humoral (tipo Th2) (Brown *et al.*, 1998). En ratones, la IL-2 e IFN- γ fueron caracterizadas como las citoquinas que más se producen en la respuesta Th1 y las IL-4, -5 y -10 predominan en la respuesta Th2. Sin embargo, se determinó que IL-10 puede producirse y regular todos los subtipos de células Th (Shafer-Weaver *et al.*, 1999). En los bovinos, durante el parto, las células CD4⁺ producen menos IL-2 e IFN- γ y más IL-4 y -10, comparadas con las células CD4⁺ obtenidas durante la lactancia tardía (Shafer-Weaver *et al.*, 1999).

Las células T CD8⁺ tienen tanto funciones citotóxicas como supresoras, por lo tanto pueden eliminar células del hospedador que expresen antígenos extraños (en asociación con el CMH clase I) o pueden controlar la respuesta inmune por supresión de la actividad de estas células durante la infección bacteriana. Por lo tanto podrían

actuar como “basureros” removiendo células secretoras viejas o dañadas, lo cual puede incrementar la susceptibilidad de la glándula mamaria a las infecciones (Taylor *et al.*, 1994; Sordillo y Streicher, 2002). Los linfocitos T supresores pueden controlar o modular la respuesta inmune a las infecciones bacterianas. Evaluación de secreciones lácteas de glándulas mamarias bovinas infectadas con *S. aureus* revelan una subpoblación de linfocitos CD8+ activados que son capaces de alterar o suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos CD4+ (Park *et al.*, 1993). Los roles inmunoregulatorios de los linfocitos CD8+ también dependen del estadio de la lactancia. Células obtenidas de la mitad de la lactancia en vacas lecheras no exhiben actividades citotóxicas y expresan principalmente IL-4 (Shafer-Weaver y Sordillo, 1997).

Las células T $\gamma\delta$ no han sido bien caracterizadas, pero se sugiere que pueden ser citotóxicas y proveer una línea única de defensa contra las infecciones bacterianas. Los linfocitos T $\gamma\delta$ migran preferentemente en las superficies epiteliales y no circulan extensivamente (Allison y Havran, 1991). La habilidad citotóxica de los linfocitos T $\gamma\delta$ sugiere que ellos son capaces de destruir células epiteliales alteradas, incluso células malignas como líneas de células de carcinomas mamarios (Miescher *et al.*, 1990). Estas células también juegan un rol en enfermedades infecciosas y por consiguiente proveen de una importante línea de defensa contra infecciones bacterianas. La contribución de las variaciones en linfocitos T $\gamma\delta$ en la inmunidad global de la glándula mamaria no está del todo clara, debido a que las funciones biológicas de estas células son aún especulativas.

El rol primario de los linfocitos B es producir anticuerpos en contra de patógenos invasores. Los linfocitos B utilizan receptores de la superficie celular para

reconocer patógenos específicos. En forma similar a los macrófagos y células dendríticas pueden funcionar como células presentadoras de antígenos. Los linfocitos B internalizan, procesan y presentan el antígeno en el contexto del CMH clase II para linfocitos T *helper*. Después de la presentación del antígeno procesado, los linfocitos T secretan IL-2, la cual induce a su vez proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos y células de memoria. A diferencia de los linfocitos T, el número de linfocitos B permanece bastante constante durante la lactancia (Shafer-Weaver *et al.*, 1996).

Las células NK son linfocitos grandes y granulares que tienen actividades citotóxicas independientes del CMH, utilizan sus receptores Fc para participar en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. Las células NK se unen a células tumorales o infectadas con virus y al degranularse secretan perforinas que destruye la célula blanco por disrupción de la membrana celular. Las células NK también son capaces de matar bacterias Gram negativas y positivas, lo que les confiere importancia en la prevención de las infecciones mamarias (Shafer-Weaver y Sordillo, 1996).

II.4.5. Defensas solubles

Los factores solubles específicos e innatos representan una importante línea de defensa dentro de la glándula mamaria que puede despertar una respuesta efectiva protectora en contra de la invasión de patógenos. Los primeros efectores solubles de la respuesta inmune específica son los anticuerpos producidos por linfocitos B activados por antígenos. Existen cuatro clases de inmunoglobulinas (Ig) conocidas,

que influyen en los mecanismos de defensa antibacterianos en la glándula mamaria: IgG1, IgG2, IgA e IgM (Guidry y Miller, 1986). En general las Ig alcanzan su pico de concentración máximo en secreciones mamarias durante la calostrogénesis e inflamación.

IgG1 es el isotipo primario encontrado en secreción mamaria sana, pero IgG2, aumenta sustancialmente durante la inflamación de la glándula mamaria. Algunos isotipos pueden actuar como opsoninas (IgG1, IgG2 e IgM) aumentando la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. Por el contrario, IgA no participa en la opsonización bacteriana, pero tiene funciones en la aglutinación de bacterias invasoras que pueden extenderse y causar infecciones bacterianas en la glándula mamaria (Musoke *et al.*, 1987).

Además de los efectos específicos de los anticuerpos, la glándula mamaria posee factores bacteriostáticos no específicos que trabajan en conjunto con las Ig o independientemente. Uno de estos factores es la lactoferrina, una proteína producida por las células epiteliales y leucocitos cuya función es unirse a los iones de hierro libres en leche y previene así el crecimiento de las bacterias que necesitan hierro para su desarrollo (Schanbacher *et al.*, 1993). En rumiantes la lactoferrina y la IgG1 actúan sinérgicamente para inhibir a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*; por otra parte, bacterias como *Streptococcus agalactiae* pueden actuar usando lactoferrina como una fuente de hierro. En la glándula mamaria bovina en lactancia, la concentración de lactoferrina es menor a la observada durante la involución e inflamación de la glándula. En adición, los efectos bacteriostáticos de la lactoferrina pueden ser inhibidos por la presencia de citrato, un buffer producido por las células epiteliales que transforma al hierro en una forma rápidamente utilizable por las

bacterias (Bishop *et al.*, 1976). En consecuencia, ha sido sugerido que el principal rol de la lactoferrina en las defensas de la glándula mamaria es proteger contra infecciones por coliformes, especialmente durante la involución (Sordillo y Streicher, 2002).

El complemento es un conjunto de proteínas presentes en suero y leche que pueden impactar en la inmunidad innata y adquirida. Las proteínas que componen el sistema de complemento son sintetizadas principalmente por los hepatocitos, y por otras células como monocitos y macrófagos tisulares. Muchas de las actividades biológicas del complemento están mediadas por los receptores de complemento localizados en una variedad de células. Las funciones efectoras del complemento incluyen, lisis de bacterias, opsonización y atracción de los fagocitos al sitio de la activación del complemento (Reiter y Oram, 1967). El complemento también funciona con un anticuerpo específico como una opsonina que promoverá la fagocitosis y lisis intracelular por neutrófilos y macrófagos de la glándula mamaria (Riollet *et al.*, 2000). La concentración de complemento en secreciones mamarias ha sido medida por sus actividades hemolíticas y bactericidas (Rainard y Poutrel, 1995; Riollet *et al.*, 2000). La concentración más baja se observa en leche de glándulas mamarias sanas durante la lactancia. En contraste, la mayor concentración de complemento se observa en calostro, leches mastíticas y en secreción mamaria obtenida durante la involución, presumiblemente debido a la trasudación de los componentes del complemento a partir de la sangre (Riollet *et al.*, 2000). Sin embargo, el significado global del sistema de complemento en la defensa de la glándula mamaria no ha sido aún bien definido. La información disponible sugiere

un rol predominante como mediador proinflamatorio durante las mastitis por coliformes (Rainard y Poutrel, 1995).

La lisozima es una proteína bactericida que está presente en leche y funciona clivando peptidoglicanos de la pared celular de bacterias Gram positivas, así como de membranas externas de bacterias Gram negativas. En leche porcina y humana, la lisozima en combinación con complemento e IgA secretoria exhiben una significativa actividad bactericida para *E. coli in vitro* (Sordillo *et al.*, 1997). Debido a que la leche de rumiantes contiene bajas concentraciones de IgA y considerable menos lisozima que la leche humana, se considera que este sistema provee una pequeña protección para la glándula mamaria bovina.

La enzima lactoperoxidasa, en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno es bacteriostática para bacterias Gram positivas y negativas. Sin embargo, muchos factores pueden variar la efectividad de este sistema en las células epiteliales de la glándula mamaria. Esta enzima es producida en bajas concentraciones por la glándula mamaria. Los niveles de tiocianato en la glándula mamaria dependen de la composición específica de la dieta en la vaca. El peróxido de hidrógeno en la glándula mamaria es generado por constituyentes enzimáticos de la leche y si están presentes, por especies de *Streptococcus* (Hibbit *et al.*, 1992). El sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno ejerce sus propiedades antibacterianas a través de la producción de hipotiocianato, un metabolito reactivo formado por la oxidación del tiocianato (Sordillo *et al.*, 1997). La enzima mieloperoxidasa producida por neutrófilos cataliza la misma reacción de peroxidación que la lactoperoxidasa y adicionalmente cataliza la oxidación de

cloruro, producto a través del cual provee de actividad bactericida al sistema. (Moldoveanu *et al.*, 1982).

Numerosos informes han mostrado las capacidades inmunomodulatorias de las citoquinas, sobre importantes funciones en leucocitos mamarios. El mayor grupo de citoquinas estudiadas incluye: IL, factor estimulante de colonias (CSF), interferón (IFN) y factor de necrosis tumoral (TNF). **Tabla 3.** Aunque todas las citoquinas tienen propiedades básicas comunes, muchas se designan como IL. Existen dos tipos de IL-1, IL-1 α e IL-1 β , que poseen una homología de un 25% entre sí. La IL-1 es secretada por diferentes tipos celulares (linfocitos T y B, células NK, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso, queratinocitos, células de Langerhans, osteoclastos, astrocitos, células mesangiales, células del timo y córnea), aunque son los monocitos/macrófagos la principal fuente de producción (Fernández Botran *et al.*, 1996). Las IL-1 α y 1 β han sido detectadas en células mamarias en leche normal de vaca usando la técnica de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Ito y Kodama, 1996; Okada *et al.*, 1997). La IL-1 es crucial en el proceso inflamatorio en glándulas mamarias inoculadas con endotoxinas o con mastitis por coliformes, tanto naturales como experimentales y en células epiteliales mamarias bovinas *in vitro* (Shuster y Kehrl, 1995; Okada *et al.*, 1997; Shuster *et al.*, 1996, 1997; Riollet *et al.*, 2000; Persson Waller *et al.*, 2003;). La contribución de la IL-1 en la respuesta a la infección mamaria por *S. aureus* es insignificante o pasajera, lo cual indica un rol menor de esta citoquina en este tipo de mastitis (Riollet *et al.*, 2000; 2001).

La IL-2 es la mejor caracterizada de todas las citoquinas en bovinos. Originalmente descrita como factor de crecimiento de células T, es primariamente

producida por linfocitos T con fenotipo Th1 y es responsable por la expansión clonal de la respuesta inmune inicial de linfocitos T y establecimiento de la memoria inmunológica seguida de estimulación mitogénica o antigénica. Esta citoquina también juega un rol en el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, aumentando la proliferación de timocitos, activando células NK e induciendo la activación de célula T citotóxicas (Alluwaimi, 2004). Existe evidencia de que la disminución de la producción endógena de IL-2 contribuye a la disminución de las capacidades inmunes, lo que puede llevar al desarrollo de enfermedad. La IL-2 bovina ha sido detectada en células de glándulas mamarias normales y mastíticas (Sordillo y Babiuk., 1991; Taylor *et al.*, 1997; Alluwaimi, 2000; Alluwaimi y Cullor, 2002;); sin embargo, el rol exacto de esta citoquina en glándula mamaria bovina no ha sido claramente dilucidado. Sordillo y Babiuk, (1991) notaron una marcada disminución de los niveles de IL-2 durante el pre parto comparado con el posparto. La disminución de las funciones celulares inmunes y el incremento de riesgo de mastitis en el periparto podrían atribuirse parcialmente a la baja actividad de la IL-2. Aunque la IL-2 ha sido detectada en mastitis por *S. aureus* y por coliformes, el rol patofisiológico exacto de esta citoquina aun permanece poco claro (Riollet *et al.*, 2000; 2001; Alluwaimi *et al.*, 2003).

La IL-8 es un citoquina bien conocida por sus propiedades quimiotácticas de neutrófilos y es producida por monocitos, macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y cierto número de líneas celulares tumorales (Matsushima y Oppenheim, 1989). Los niveles transcritos de ARNm para IL-8 han sido estudiados en glándula mamaria bovina sana en la mitad y al final de la lactancia (Alluwaimi *et al.*, 2003) sin observarse variaciones significativas entre los periodos estudiados.

El factor estimulante de colonias (*colony stimulation factor -CSF-*) constituye un grupo de citoquinas requeridas para la proliferación y diferenciación de una variedad de células madre hematopoyéticas. Estos factores de crecimiento son diferentes glicoproteínas que se unen a las células por un receptor común y son producidos por una variedad de células, incluidas células endoteliales, fibroblastos, macrófagos y células T. Cada CSF tiene como blanco una línea celular específica que expande o activa esta función. La pronunciada influencia de granulocitos (G)-CSF en poblaciones celulares fagocíticas sugiere posibles aplicaciones clínicas en la prevención de enfermedades bacterianas infecciosas como la mastitis (Sordillo y Streicher, 2002). El G-CSF recombinante humano ha sido administrado SC en vacas en dosis que variaron entre 1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por día, resultando en un incremento de neutrófilos en sangre periférica después de los 3-5 días post inyección (Cullor *et al.*, 1990). El tratamiento con G-CSF ha mostrado una disminución al azar y directa de la migración de neutrófilos e incremento de la fagocitosis y actividad bactericida. Granulocitos-macrófagos (GM)-CSF fue identificado por primera vez por su capacidad de inducir células progenitoras hematopoyéticas diferenciadas en granulocitos y macrófagos. Varios estudios en vacas lecheras han mostrado que GM-CSF no es solamente una importante molécula que induce el crecimiento de estos tipos celulares, también afecta una variedad de funciones de los granulocitos maduros (Daley *et al.*, 1993). El tratamiento de sangre periférica bovina y neutrófilos de glándula mamaria con GM-CSF recombinante bovino (rb) incrementó significativamente las capacidades bactericidas y quimiotácticas de estas células. La infusión intramamaria de GM-CSF (rb) con dosis mayores a 5 mg no afectaron significativamente el recuento total de células somáticas, pero incrementaron la

habilidad de los neutrófilos residentes para producir superóxido e incrementó el porcentaje de células fagocíticas (Daley *et al.*, 1993).

El interferón (IFN) es un grupo de proteínas relacionadas de dos clases principales. El IFN clase I consiste en tres tipos relacionados: IFN- α , IFN- β e IFN- ω . IFN- α e IFN- β son producidos por una gran variedad de células en respuesta a varios inductores que incluyen infecciones virales, productos bacterianos y células tumorales. Ha sido postulado que las enterotoxinas estafilocócicas estimulan la copiosa síntesis de IFN- γ y de otras citoquinas por parte de las células T CD8+ y CD4+ debido a la actividad de súper antígenos de estas enterotoxinas (Yokomizo *et al.*, 1995). Sin embargo, en estudios realizados por Alluwaimi *et al.* (2003) en mastitis experimentales por *S. aureus*, no se observó que la actividad transcripcional de IFN- γ cambiara significativamente.

Citoquina	Función
IL-1	Media la respuesta inflamatoria de fase aguda: incremento del número de neutrófilos; aumento de actividades de fagocitosis y bactericidas de los neutrófilos: activación de migración de neutrófilos en glándula mamaria infectada.
IL-2	Aumenta la proliferación de células mononucleares en glándula mamaria; aumenta las actividades citotóxicas y bactericidas de los linfocitos; aumenta el número de células plasmáticas; activa células NK
IL-8	Induce inflamación. Induce la migración de neutrófilos mediante IL-1. Potente agente quimiotáctico.
G-CSF	Incrementa el número de neutrófilos en sangre y leche. Incrementa el recuento de células somáticas en leche. Incremento de las actividades fagocíticas y bactericidas. Disminuye la migración de neutrófilos.
GM-CSF	Aumenta las actividades quimiotácticas y bactericidas de neutrófilos. Incrementa las actividades citotóxicas. Incrementa el número de células fagocíticas.

M-CSF	Regula la proliferación y diferenciación de macrófagos. Potente agente quimiotáctico de macrófagos.
IFN-γ	Aumenta las actividades fagocíticas y bactericidas de neutrófilos. Efectos supresores inversos sobre las secreciones mamarias.
TNF-α	Aumenta la respuesta inflamatoria de fase aguda. Aumenta las actividades fagocíticas y bactericidas de neutrófilos. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión endoteliales.

Tabla 3: Efecto de las citoquinas en la respuesta inflamatoria e inmune en glándula mamaria (Adaptado de Sordillo y Streicher, 2002).

II.5. Vacunas

Investigaciones realizadas durante las últimas dos décadas permitieron la identificación de factores de virulencia de *S. aureus* que estimulan la producción de anticuerpos que pueden ser beneficiosos para el control de la enfermedad (Foster, 1991; Sutra y Poutrel, 1994). Consecuentemente se desarrollaron vacunas conteniendo componentes pseudocapsulares, capsulares y tóxicos, algunas de las cuales se mostraron efectivas en ensayos de campo para reducir la incidencia de IIM subclínicas y clínicas por este organismo (Watson y Schwartzkoff, 1990; Nickerson *et al.*, 1993; Nordhaug *et al.*, 1994; Giraudo *et al.*, 1997). También se generaron inmunógenos experimentales compuestos por proteínas de fusión comprendiendo el dominio de unión a la fibronectina de *S. aureus* (Mamo *et al.*, 1994). Recientemente se evaluaron vacunas compuestas por fragmentos bacterianos insolubles y lisados de cultivos de *S. aureus* conteniendo distintos antígenos somáticos que confirieron protección a los animales vacunados (Leitner *et al.*, 2000; Nickerson *et al.*, 2000). En la mayoría de los casos, las vacunas desarrolladas comprendieron componentes de la

superficie bacteriana que están presentes en algunas cepas o tipos, confiriendo fundamentalmente protección contra cepas o tipos homólogos. En otros casos, la relevancia de los factores que integran las vacunas, desde el punto de vista patogénico o protector, no ha sido claramente establecida. La identificación de moléculas involucradas en la inmuno protección que estén presentes en la variedad de cepas aisladas en nuestro país es de importancia fundamental, ya que permitirá elaborar un prototipo de vacuna que estimule una reacción inmune contra la mayoría de las cepas causantes de IIM en el rodeo lechero nacional.

Staphylococcus aureus expresa varios componentes asociados a la pared celular, como la proteína A y la proteína de unión a la fibronectina, las cuales han sido estudiadas como posibles antígenos vacunales (Foster, 1991; Nelson *et al.*, 1991). Sin embargo, debido a la pobre protección proporcionada luego de la inmunización con bacterinas tradicionales, se ha fijado la atención recientemente al posible rol de los CPs en la patogénesis (Foster, 1991). Se ha determinado que los CPs de *S. aureus* incrementan la resistencia a la fagocitosis (Foster, 1991; Rainard y Poutrel, 1991; Watson *et al.*, 1993). Estos CPs son expresados durante el crecimiento *in vivo* (Watson y Prideaux 1979; Watson, 1982; Hensen *et al.*, 2000) y su producción *in vitro* está influenciada por la composición del medio de cultivo (Norcross y Opdebeeck 1983; Rather *et al.*, 1986; Mamo *et al.*, 1987; Johne *et al.*, 1989; Watson y Watson, 1989 Rainard y Poutrel, 1991).

Hasta el momento, las vacunas para controlar IIM por *S. aureus* han mostrado una eficacia dispar (Middleton, 2008; Denis *et al.*, 2009). La falta de efectividad de las vacunas puede ser atribuida al incompleto conocimiento de la patogénesis de las mastitis estafilocócicas, de los mecanismos de defensa de la glándula mamaria de

los rumiantes y de los antígenos de mayor relevancia para lograr una adecuada protección (Rainard y Poutrel, 1991; Watson, 1992; Middleton, 2008).

Recientemente, se exploró un nuevo enfoque consistente en la vacunación con ADN o ADN/proteínas que confirió protección parcial contra el desafío experimental por *S. aureus* en ratones y vacas lecheras (Brouillette *et al.*, 2002; Shkreta *et al.*, 2004). Las vacunas de ADN se basaron en los epitopes más conservados de la FNbp y de *clumping factor A* de *S. aureus* y produjeron respuesta inmune tanto humoral como celular (Pérez-Casal *et al.*; 2006).

Las vacunas generadas para el control de IIM causadas por *S. aureus* han sido administradas por diversas vías y formuladas con diferentes tipos de adyuvantes, obteniéndose resultados variables (Guidry *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 2000; Sears, 2002; Leitner *et al.*, 2003 a,b). Respecto de las vías de inoculación, se realizaron pruebas tratando de determinar el efecto de la vacunación utilizando diferentes vías, como la intramuscular y la intramamaria (Guidry *et al.*, 1994). Al comparar los títulos de anticuerpos, se determinó que las vacas inmunizadas en la cercanía del linfonódulo supramamario presentaron títulos de IgG1 e IgG2 más elevados que se mantuvieron hasta 120 días post parto. Los títulos de IgM, se elevaron durante el período seco, pero declinaron a los niveles preinmunización al parto. Con la inmunización IM, se obtuvieron niveles de anticuerpos inferiores y la respuesta se observó más tardíamente (Guidry *et al.*, 1994). Otros autores utilizaron las mismas vías de inoculación inmunizando las vacas con una infusión de *S. aureus* muertos, una al final de la lactación y otra preparto; observando un incremento del título de anticuerpos en suero sanguíneo, aunque las concentraciones en leche no fueron afectadas (Mellenberger, 1977; Nickerson *et al.*, 1993).

Se han realizado otros ensayos comparando otras vías de inoculación con la vía supramamaria, obteniéndose resultados similares tras la inoculación por vías distintas (Nickerson *et al.*, 1993). Sin embargo, en un estudio anterior (Watson y Lascelles, 1975), se probó la inoculación IM de una bacterina al finalizar la lactación y luego una nueva inoculación, preparto, en el área del linfonódulo supramamario (LNSM), resultando en un elevado título de anticuerpos durante las siguientes lactancias y la radicación de células linfoides sensibilizadas, productoras de cantidades significativas de IgA e IgM en el tejido mamario en involución. Estas discrepancias sugieren que todas las variables mencionadas, composición antigénica, adyuvante y vía de inoculación contribuyen significativamente a la generación de la respuesta inmune. Por lo tanto, todas deben ser consideradas al momento de la formulación de un inmunógeno experimental.

III-MATERIALES Y MÉTODOS

III-MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales y métodos del objetivo N° 1:

Determinar por métodos genotípicos y fenotípicos la prevalencia y distribución de tipos de polisacáridos capsulares en aislamientos de *Staphylococcus aureus* de infecciones intramamarias (IIM) de vacas pertenecientes a rodeos lecheros de distintas cuencas de Argentina.

III.1.2. Aislamientos bacterianos.

Se obtuvieron 157 aislamientos de leche de bovinos con infecciones intramamarias (IIM) subclínicas y clínicas provenientes de tambos ubicados en la cuenca lechera central de Argentina (centro-oeste de Santa Fe y este de Córdoba) y de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. Las mismas fueron aisladas a partir de muestras recibidas en el laboratorio de Sanidad Animal de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Rafaela y en el laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral. Los aislamientos de la provincia de Buenos Aires fueron provistos por la Dra. Liliana Tirante (Lactodiagnóstico Sur). Se procedió a la caracterización primaria de las cepas utilizando metodología estándar (Hogan *et al.*, 1999). De cada establecimiento lechero se tomaron entre uno a tres aislamientos. Los aislamientos luego de su identificación tentativa fueron preservados en un medio conteniendo infusión cerebro corazón con el agregado del 15% de glicerol y mantenidos a -20°C hasta su uso posterior.

Sobre la base de los datos clínicos aportados por los profesionales remitentes de la muestras, el origen de los aislamientos se clasificó como clínico cuando provinieron de secreción mamaria con alteraciones macroscópicas y signos inflamatorios y subclínico cuando provinieron de leche sin alteraciones macroscópicas, ausencia de signos de inflamación clínica y RCS superiores a 200.000 cél /mL. El número de aislamientos por provincia fue el siguiente: Santa Fe (n=91), Buenos Aires (n=31), Córdoba (n=22) y Entre Ríos (n=13). Cuarenta y tres se obtuvieron a partir de casos clínicos, 91 subclínicos, mientras que no pudo determinarse el origen de los 23 restantes.

Las cepas congeladas fueron reactivadas mediante siembra en agar base Columbia, incubándose por 24 hs a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se repicaron en agar base Columbia enriquecido con 5% de sangre de ternero, incubándose en las mismas condiciones detalladas más arriba. Los aislamientos fueron identificados sobre la base de las siguientes características y pruebas: morfología colonial, producción de hemolisinas, coloración de Gram, prueba de catalasa, pruebas de coagulasa libre y ligada (*clumping factor*), producción de acetoina, prueba de oxidación y fermentación, desarrollo selectivo en medio agar P adicionado con 7µg/ml de acriflavina (Roberson *et al.*, 1982). Aquellos aislamientos que dieron resultados fenotípicos dudosos no fueron incluidos en este estudio.

III.1.3. Genotipificación de polisacáridos capsulares

Los aislamientos congelados fueron reactivados por cultivo en Columbia agar base adicionado con 5% de sangre de ternero a 37°C por 18 hs. El ADN genómico de cada aislamiento fue extraído con fenol-cloroformo mediante un procedimiento estándar descrito por Pospiech y Neumann (1995). La presencia de los loci *cap5k* y *cap8I* fue evaluada en todos los aislamientos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción fue realizada utilizando ADN genómico como molde en un volumen total de 25µl conteniendo: 1x buffer PCR, 2mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), 1U/µl ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (PB-L, Argentina) y 0,2 µM de los cebadores: Cap5k1 (5'-GTCAAAGATTATGTGATGCTACTGAG-3'), Cap5k2 (5'-ACTTCGAATATAAACTTGAATCAATGTTATACAG-3'), Cap8k1 (5'-GCCTTATGTTAGGTGATAAAC-3'), Cap8k2 (5'-GGAAAAACACTATCATAGCAGG-3') (Invitrogen Argentina, Buenos Aires), siguiendo la descripción de Verdier *et al.*, (2007). La amplificación fue realizada en un termociclador (GeneAmp PCR System, Applied Biosystems, EE.UU.) usando el siguiente programa: desnaturalización inicial de 5-minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridación y 1 minuto de extensión a 72°C; con un paso de extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (Biodynamics, B.A. Argentina). Los tamaños de los amplicones fueron de 361 pares de bases (bp) para el genotipo capsular 5 y 173 bp para el genotipo capsular 8.

III.1.4. Tipificación serológica

III.1.4.1 Anticuerpos:

Se prepararon suspensiones bacterianas de cultivos de las cepas prototípicas de *S. aureus* CP5 (Reynolds) y CP8 (Becker). Las cepas se cultivaron en Columbia agar base (Britania, Buenos Aires) adicionado con 2,5% NaCl a 37°C durante 18 hs, se cosecharon e inactivaron siguiendo el protocolo previamente descrito por Karakawa *et al.*, (1985). Con cada cepa prototípica fueron inmunizados 2 conejos de raza neocelandesa con un peso de 3 Kg., de acuerdo con el esquema descrito por Karakawa *et al.*, (1985). Los sueros de conejo obtenidos fueron absorbidos con la cepa acapsulada *S. aureus* 57 a fin de remover los anticuerpos contra antígenos no capsulares siguiendo la descripción previa de Karakawa *et al.*, (1985). Cada antisuero específico fue dividido en alícuotas y almacenado a -70°C hasta su uso.

III.1.4.2 Aislamiento y purificación de CP:

Los CP de las cepas prototípicas 5 (Reynolds), 8 (Becker) y de todos los aislamientos tipificados por métodos genotípicos (n=101) fueron aislados y purificados siguiendo la descripción de Fattom *et al.*, (1990) con algunas modificaciones. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 18 hs en agar Columbia suplementado con 2,5% de NaCl a fin de obtener un crecimiento confluyente. Las células bacterianas fueron cosechadas, resuspendidas en 7 ml de PBS, agitadas por 90 minutos en un agitador magnético y centrifugadas por 30

minutos a 4°C. Los carbohidratos fueron precipitados con etanol y luego centrifugados. El pellet obtenido fue precipitado dos veces con etanol, centrifugado y resuspendido en PBS 1x. Finalmente, la suspensión fue tratada con periodato de sodio (10,7 mg/ml) y proteinasa K (0,1 mg/ml) para eliminar ácidos teicoicos y proteínas. El producto de purificación fue dializado contra PBS, liofilizado y preservado a -20°C. La concentración de polisacáridos fue determinada por el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). La presencia de CP fue observada por electroforesis (SDS-Page) y tinción con sales de plata. La ausencia de proteínas fue verificada por el método del ácido bicinónico (Smith *et al.*, 1985) y electroforesis (SDS-Page) seguida por tinción con Coomassie Blue.

III.1.4.3 Enzimo inmuno ensayo:

Las pruebas fueron realizadas de la siguiente forma: 5 µg de CP purificados obtenidos de los aislamientos que por caracterización genotípica poseían los genes *cap5* y *cap8* fueron usados como antígenos para sensibilizar placas de 96 pocillos. Las placas fueron bloqueadas con PBS adicionado de leche en polvo al 5% e incubadas con antisueros CP5 ó CP8 (1:200), respectivamente. Finalmente, un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa alcalina fue utilizado como anticuerpo secundario y la reacción fue revelada con TMB (Zimed). Todas las incubaciones fueron realizadas a 37°C por 60 min. Las densidades ópticas (DO) fueron medidas a 450 nm en un lector de ELISA (Molecular Device).

III.1.5. Análisis estadístico

Se utilizó el test de Chi cuadrado para comparar la distribución porcentual de tipos de CP entre provincias y la distribución porcentual de tipos capsulares respecto del origen clínico de los aislamientos.

III.2. Materiales y Métodos del Objetivo N° 2:

Evaluar la respuesta inmune humoral a una bacterina formulada con una cepa de referencia del tipo capsular más prevalente entre aislamientos de *Staphylococcus aureus* de IIM de vacas de rodeos de distintas cuencas utilizando distintas vías de inoculación.

III.2.1 Vacuna experimental

Consistió en una cepa de referencia de *S. aureus* con CP5 (Reynolds). 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. 100 μl del cultivo se sembraron en agar tripticasa 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), 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 Al (OH) 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.

III.2.2 Animales experimentales y diseño experimental

Se utilizaron 18 vaquillonas Holstein preñadas, en el último trimestre de gestación, del rodeo de la Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela, 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 supramamaria (G1), otro en la tabla del cuello (G2) y el tercero actuó como placebo 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 siguiendo 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 presencia de cuartos mamarios con anomalías a 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*.

III.2.3 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 la **Tabla 4**. Las muestras de suero fueron conservadas a -20°C por un período no mayor a un mes antes de su procesamiento.

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

Tabla 4. Esquema de vacunación, tipos de muestras y frecuencia de muestreo.

III.2.4 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.

III.2.5 Métodos serológicos

Los anticuerpos generados contra la bacterina fueron evaluados por un test de ELISA. Las placas de 96 pocillos fueron cubiertas durante 1 h a 37°C con una suspensión de la bacterina en PBS (pH 7,2) conteniendo 1µg/pocillo. Entre cada paso, las placas fueron lavadas 3 veces con Tween 20 al 0,05%. 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 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) 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.

III.2.6 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 anticuerpos, medidas como DO, de los diferentes grupos de tratamiento a través del tiempo, empleándose un modelo factorial para los factores tratamiento (placebo,

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 (ANOVA), seguido por el test de Duncan en caso de obtener diferencias significativas.

IV-RESULTADOS

IV-RESULTADOS

IV.1. Resultados Objetivo N°1

IV.1.1 Genotipificación

Ochenta y tres (52,87%) aislamientos fueron genotipificados como *cap5*, mientras que 18 (11,46%) como *cap8* con primers específicos, siendo el resto de los aislamientos (35,49%) no tipificables (NT). Ninguno de los aislamientos positivos para *cap5* o *cap8* mostró reacción de amplificación para ambos genes simultáneamente, confirmando la especificidad de la PCR utilizada.

La distribución de genotipos entre los aislamientos originados en diferentes áreas geográficas se muestra en la Tabla 5. El *cap5* fue el genotipo capsular prevalente entre los aislamientos de las provincias de Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos. Inversamente, la mayoría de los aislamientos en la provincia de Buenos Aires, fueron NT, mientras que entre los aislamientos genotipificables, el tipo predominante fue *cap5*. La distribución de los genotipos y el porcentaje de aislamientos NT variaron entre las provincias; sin embargo las diferencias no fueron significativas ($P=0,227$). Más del 50% de los aislamientos de cada provincia pudieron ser genotipificados por la metodología de PCR.

Entre los aislamientos provenientes de casos de IIM clínicas, 31 (72,1%), fueron genotipificados como *cap5* o *cap8*, mientras que solamente 12 (27,9%) fueron NT. De 91 aislamientos de IIM subclínicas, 53 (58,2%), fueron tipificados como *cap5* o

cap8 y 38 (41,8%), como NT. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de aislamientos de acuerdo a su origen clínico (P=0,12).

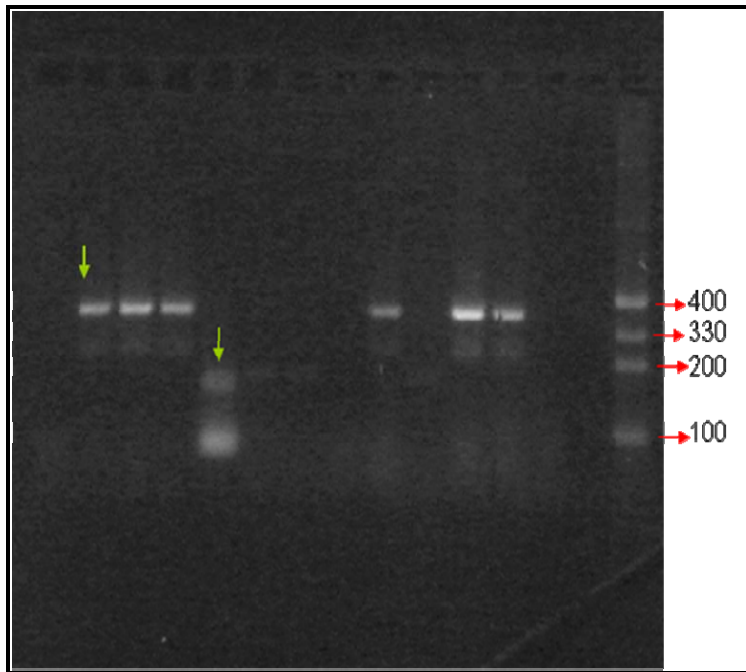


Imagen 1: Gel de agarosa donde se visualizan las bandas de amplificación para los tipos capsulares. **Calles:** 1-NT, 2/4: CP5, 5: CP8, 6/8: NT, 9: CP5, 10: NT, 11: CP5, 12: Control + (CP5), 13: Control – (St. uberis), 14: Blanco, 15: Marcador de Peso Molecular.

Provincias					
CP Genotipo	Santa Fe	Entre Ríos	Córdoba	Buenos Aires	Total
<i>Cap5</i> (%)	46 (50,5)	10 (76,9)	16 (72,7)	11 (35,5)	83 (52,9)
<i>Cap8</i> (%)	11 (12,1)	1 (7,7)	0 (0)	6 (19,3)	18 (11,4)
NT(*) (%)	34 (37,4)	2 (15,4)	6 (27,3)	14 (45,2)	56 (35,7)

Tabla 5: Distribución de genotipos capsulares 5 y 8 entre aislamientos de *Staphylococcus aureus* aislados de infecciones intramamarias bovinas en cuatro provincias de la Argentina.

Ref.: (*) NT: no tipificables

IV.1.2 Tipificación serológica

Ciento un cepas tipificadas como *cap5* o *cap8* por PCR fueron además evaluadas por ELISA para determinar la capacidad de producir CP. Los aislamientos genotipificados como *cap5* o *cap8* fueron evaluados con anti CP5 y anti CP8, respectivamente. Los resultados de la serotipificación son mostrados en la **Tabla 6**. El 50% de los aislamientos genotipificados como *cap5* y *cap8* demostraron por ELISA expresar el fenotipo capsular. Treinta y nueve aislamientos (38,6%) reaccionaron con el suero anti CP5 y doce (11,9%) con anti CP8.

De ochenta y tres aislamientos genotipificados como *cap5*, 39 (46,9%) fueron capaces de expresar CP; mientras que de 18 aislamientos genotipificados como *cap8*, doce (66,6%) tuvieron la capacidad de expresar CP. No fue encontrada asociación estadística entre la expresión de CP5 o CP8 y el origen clínico de los aislamientos. De ochenta y cuatro aislamientos genotipificados como *cap5* o *cap8*, de los cuales se conocía su origen clínico, 31 (37%), provinieron de IIM clínicas, y entre estos

aislamientos, 14 (45,2%), fueron serotipificables, mientras que 17 (54,8%) fueron NT. Entre los aislamientos provenientes de casos subclínicos, 53 fueron genotipificados como *cap5* y *cap8* (63%). Entre estos, 27 (50,9%) y 26 (49,1%) fueron serotipificables y no serotipificables, respectivamente.

Provincias					
CP Fenotipo	Santa Fe	Entre Ríos	Córdoba	Buenos Aires	Total
CP5 (%)	19 (33,3)	6 (54,5)	6 (37,5)	8(47,1)	39 (38,6)
CP8 (%)	8 (14,0)	0	0	4 (23,5)	12 (11,9)
NT (*) (%)	30 (54,7)	5 (45,5)	10 (62,5)	5 (29,4)	50 (49,5)
Total	57	11	16	17	101

Tabla 6: Distribución de los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 de *Staphylococcus aureus* aislados de infecciones intramamarias bovinas en cuatro provincias de Argentina.

Referencias: (*) NT: no tipificable

IV.2. Resultados objetivo N° 2

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 respectivamente, 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 títulos de IgG total 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 títulos 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 diferencias entre títulos 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 títulos de IgG total de ambos grupos vacunados difirieron significativamente del placebo ($P < 0,05$), aunque no se detectaron diferencias significativas entre los títulos de ambos grupos. En cuanto a los valores en leche, los niveles de IgG específicos resultaron significativamente superiores en los grupos vacunados respecto del placebo ($P < 0,05$). No se detectaron diferencias en título de IgG total entre los grupos de vaquillonas vacunadas en la tabla del cuello y en el área supramamaria.

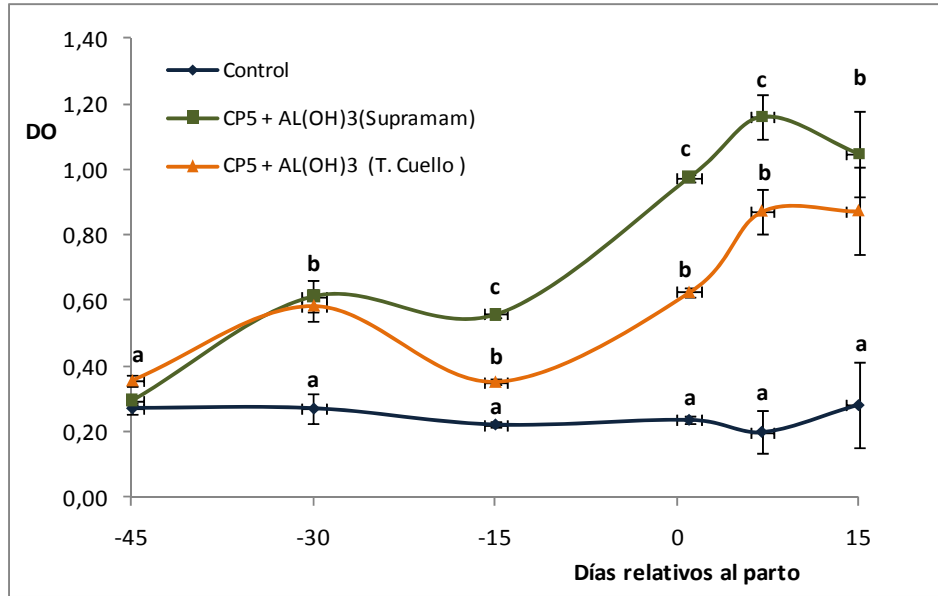


Figura 1: Título promedio de IgG total en suero de vaquillonas inmunizadas por dos vías de inoculación distintas con una bacterina tipo capsular 5 de *Staphylococcus aureus*. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas. Las barras en cada punto representan el desvío estándar.

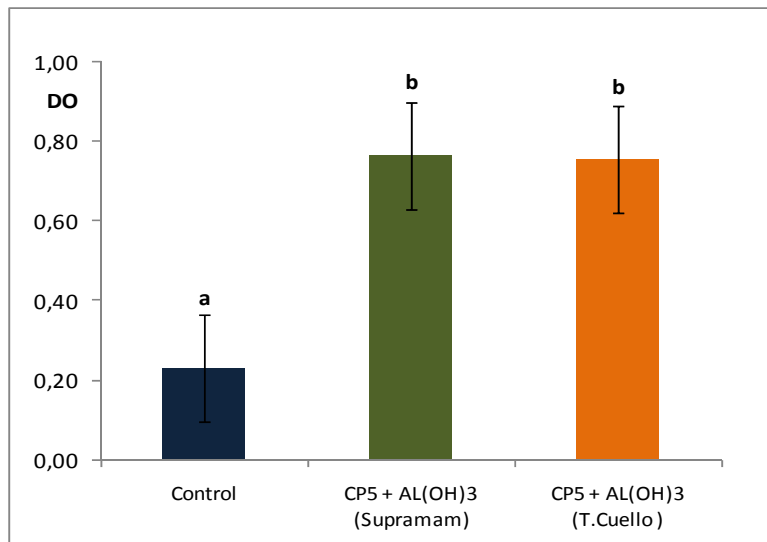


Figura 2: Título de IgG promedio en leche de vaquillonas inmunizadas por dos vías de inoculación distintas con una bacterina tipo capsular 5 de *Staphylococcus aureus* a los 14 días post parto. Letras diferentes en cada tratamiento indican diferencias significativas. Las barras en cada punto representan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

V- DISCUSIÓN

V-DISCUSIÓN

Objetivo N°1

Los CP pueden conferirle a *S. aureus* capacidad para evitar la activación del complemento y evadir la fagocitosis. Una disminución de la unión de los fragmentos de C3 con las bacterias que poseen CP y el enmascaramiento de los fragmentos C3 han sido asociados con una marcada disminución de la fagocitosis por neutrófilos (Cunnion *et al.*, 2003). Sin embargo, los anticuerpos contra los CP favorecen la opsonización y la fagocitosis y subsecuentemente la eliminación de los fagosomas de los macrófagos de humanos y bovinos (Guidry *et al.*, 1994; Cunnion *et al.*, 2003; Kampen *et al.*, 2005). Por lo tanto los CP, entre otros antígenos, han sido considerados como candidatos para ser incluidos en vacunas experimentales (O'Brien *et al.*, 2000; Tollersrud *et al.*, 2001; Schafer y Lee, 2009). Existe, una vacuna comercial disponible para el control de mastitis por *S. aureus* que contiene cepas capsuladas que expresan diferentes serotipos de polisacáridos capsulares presentes entre la población de aislamientos bovinos en EEUU (Mah *et al.*, 2004). Consecuentemente, la información sobre la prevalencia y la distribución geográfica de los serotipos capsulares en las principales cuencas lecheras de Argentina, es importante para diseñar las vacunas basadas en estos componentes.

Se han llevado a cabo estudios sobre la distribución de los serotipos capsulares de *S. aureus* aislados de IIM bovinas principalmente en países europeos y EEUU; mientras que los reportes provenientes de otras regiones del mundo, son escasos (Sordelli *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2000). La proporción de cepas que pudieron ser tipificadas por la metodología fenotípica y la distribución de los serotipos capsulares

en estas poblaciones, variaron entre los diferentes estudios (Sompolinsky *et al.*, 1985; Poutrel *et al.*, 1988; Guidry *et al.*, 1997; Hata *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios realizados por hibridación de ADN, demostraron que un número variable de los aislamientos bovinos de *S. aureus* que no pudieron ser tipificados por metodología fenotípica (NT), eran portadores de los genes necesarios para la síntesis capsular (Sordelli *et al.*, 2000; Tollersrud *et al.*, 2000). En el presente estudio, todos los aislamientos fueron evaluados para determinar la presencia de secuencias de ADN que codifican regiones específicas para *cap5* y *cap8*, demostrando que el 52,9% correspondieron al genotipo *cap5*, el 11,4 % para al genotipo *cap8*, mientras que el 35,7 % restante no portaba ninguna de esas secuencias. Cuando fue analizada la expresión fenotípica de los CP, en los aislamientos positivos para *cap5* y 8, solamente el 24,6% de un total de 157 aislamientos, expresaron el CP5 y el 7,6% expresaron el CP8.

La prevalencia de aislamientos que expresan CP5 y CP8 en este estudio (32,2%), fue menor que la observada en la mayoría de los estudios previos. El 69% de *S. aureus* aislados de casos clínicos y subclínicos de IIM de diferentes regiones de Francia recolectadas entre 1958 y 1987, expresaron CP5 y CP8, (Poutrel *et al.*, 1988), mientras que de 273 aislamientos que pertenecían a cuatro regiones geográficas diferentes de EE.UU., el 41%, expresaron CP5 y CP8 (Guidry *et al.*, 1997). Estudios más recientes realizados en Europa y Estados Unidos, que incluyeron 636 aislamientos mostraron una prevalencia de expresión de CP entre el 48 al 87%, la cual varió significativamente entre los distintos países (Tollersrud *et al.*, 2000). Por otro lado, la prevalencia de los serotipos CP5 y CP8 en Japón fue del 89,6% (Hata *et al.*, 2006), mientras que un estudio realizado en Israel, que incluyó 17

aislamientos a partir de 10 tambos mostraron que solo 3 fueron CP5 y Cp8 y el resto NT (Sompolinsky *et al.*, 1985). En Argentina, un estudio previo a partir de 195 aislamientos, demostró que solamente el 14% pudo ser tipificado con antisueros específicos contra CP5 y CP8 (Sordelli *et al.*, 2000). Aunque el porcentaje total de aislamientos que expresaron CP5 fue del 18% más alto en el presente estudio, la prevalencia de la expresión de CP8 estuvo en acorde con lo reportado por Sordelli *et al.*, (2000) (6,6%). La diferencia entre los estudios en la proporción de aislamientos que expresan CP5, podría ser explicado principalmente por el origen y la fecha de la obtención de los aislamientos. Mientras que la mayoría de los aislamientos provenientes del estudio previo pertenecían a la provincia de Buenos Aires, los aislamientos de *S. aureus* incluidos en la presente investigación fueron obtenidos a partir de las cuatro principales provincias lecheras de la Argentina. Aunque algunas áreas geográficas consideradas en ambos estudios se superponen, los aislamientos previos provenían de distintas explotaciones lecheras y fueron obtenidas con casi 10 años de diferencia. En el presente estudio, para evitar el sesgo producido por la diseminación clonal, se incluyeron como máximo 3 aislamientos por tambo. Este diseño asegura diversidad de aislamientos entre cada área geográfica considerada. Sin embargo, no hubo diferencia entre las provincias en la distribución de los genotipos y fenotipos de los CP.

En el presente estudio, la mitad de los aislamientos que portaban genotipos *cap5* y *cap8* no expresaron CP *in vitro*. Una baja proporción de expresión fenotípica con respecto a la detección genotípica fue reportada en aislamientos de mastitis bovina en Europa y Estados Unidos por Tollersrud *et al.*, (2000), quien describió que 50 aislamientos NT poseían los genotipos *cap5* o *cap8*. En un estudio realizado

recientemente a partir de *S. aureus* de origen bovino principalmente de Francia y Brasil, se encontró que el 96,1% portaba los genes para los genotipos capsulares 8 o 5 (Alves *et al.*, 2009). Aunque el fenotipo no fue evaluado en este último estudio, la elevada predominancia de los genotipos *cap8* y *5*, contrastan con la baja expresión capsular previamente reportada en aislamientos a partir de ganado lechero en Francia (69,4%) (Poutrel *et al.*, 1988). La disparidad entre genotipo-fenotipo podría indicar una restricción en la expresión fenotípica debido a las diferencias entre las condiciones de cultivo *in vivo* vs. *in vitro*. En el presente estudio fueron usadas condiciones de crecimiento favorables para la producción de cápsula; sin embargo, hay que señalar que no todos los factores involucrados en la expresión de CP durante las IIM naturales son conocidos (O’Riordan y Lee, 2004). De hecho, se ha observado variabilidad en la expresión de CP entre aislamientos bajo diferentes condiciones, e incluso entre clones de un mismo aislamiento (Poutrel *et al.*, 1995, 1997). En un informe reciente se ha descrito que los aislamientos de CP5 que no expresan la cápsula *in vitro* tienen la habilidad de expresarla *in vivo*, en modelos en ratones tanto durante una bacteriemia como en un modelo de infección de heridas (Nanra *et al.*, 2009). Esto implica que la evaluación fenotípica convencional puede subestimar la habilidad de expresar CP *in vivo*. Otra explicación para la disparidad genotipo-fenotipo está basada en el hecho de que algunos aislamientos pueden llevar genes *cap*, pero la falta de expresión de cápsula puede deberse a mutaciones dentro de los genes que codifican para la cápsula (Cocchiario *et al.*, 2006). Al respecto, vale destacar que las 21 cepas de *S. aureus* utilizadas para realizar este último estudio fueron aisladas de IIM bovinas en Argentina y que pueden tener características genéticas similares a los aislamientos del presente estudio. Ocho de los 21

aislamientos que fueron seleccionados por la falta de expresión de CP5 o CP8 en el estudio previo, poseían cluster 5, pero presentaban mutaciones entre los genes capsulares esenciales. Finalmente, mutaciones en las regiones promotoras o anomalías en los genes reguladores de la producción de CP pueden generar una reducción de la expresión capsular. Usando las mismas condiciones controladas *in vitro* se observó que en aislamientos de *S. aureus* de origen bovino expresaron niveles diferentes de CP (Tollersrud *et al.*, 2000). Estos resultados fueron coincidentes con nuestras observaciones en las que las lecturas de DO en el test de ELISA fueron heterogéneas entre los aislamientos evaluados (datos no mostrados). En consecuencia, algunas cepas pueden expresar cantidades bajas de CP o producir CP por debajo del umbral de detección del método experimental utilizado o no pueden expresar los CP a pesar de llevar las secuencias de *cap5* u 8.

En un estudio previo fue sugerida la correlación entre la expresión de CP y la severidad de los casos clínicos de mastitis por *S. aureus* en aislamientos provenientes de Islandia e Irlanda (Tollersrud *et al.*, 2000). Estos autores encontraron una asociación significativa entre la expresión capsular y las manifestaciones clínicas para CP8. Por el contrario, en el presente estudio no se observó asociación entre los genotipos o fenotipos y el origen clínico de los aislamientos. Estudios recientes, han demostrado la asociación entre los genotipos, la aparición de IIM clínicas y las características epidemiológicas (Haveri *et al.*, 2005, Fournier *et al.*, 2008); sin embargo, la asociación no fue establecida con la presencia de un gen individual, sino con patrones que incluyeron un conjunto de genes (Fournier *et al.*, 2008).

Objetivo N°2

La inmunización contra mastitis producidas por *Staphylococcus aureus* en rumiantes ha sido sujeto de investigación durante mucho tiempo (Nordhaug *et al.*, 1994). Diferentes vacunas basadas en antígenos celulares o solubles, con o sin adyuvantes, han sido administrados en vacas lecheras y otros rumiantes; pero tanto la protección contra la infección como contra la enfermedad no han proporcionado buenos resultados en la mayoría de los experimentos (Colditz y Watson, 1985).

Durante las últimas dos décadas se han identificado factores de virulencia de *S. aureus* involucrados en distintas etapas de la IIM causada por este organismo (Sutra y Poutrel, 1994; Kerro Dego *et al.*, 2002). Consecuentemente se desarrollaron vacunas que incluyeron cepas bacterianas enteras productoras de CP (Guidry *et al.*, 1994; Giraudo *et al.*, 1997); y adicionadas con toxoides (Watson y Schwartzkoff, 1990; Nickerson *et al.*, 1993), algunas de las cuales se mostraron efectivas en ensayos de campo para reducir la incidencia de IIM subclínicas y clínicas por este organismo y estuvieron comercialmente disponibles en nuestro país (Giraudo *et al.*, 1997) y en otros países (Watson y Schwartzkoff, 1990; Nickerson *et al.*, 1993). Estos inmunógenos, así como otros de más reciente desarrollo que incluyeron CP conjugados con proteínas (Gilbert *et al.*, 1994; Herbelin *et al.*, 1997; Tollesrud *et al.*, 2001) generan respuestas de IgG₁ e IgG₂, reconocidas por su actividad opsonofagocítica, la cual puede aumentar la eficiencia de los polimorfo nucleares (PMN), considerados la principal línea defensiva de la glándula mamaria bovina (Paape *et al.*, 2002). La conjugación de CP con proteínas incrementa la producción de anticuerpos específicos contra los CP (Fattom *et al.*, 1990; 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).

Para lograr una respuesta inmune humoral óptima, se han utilizado no solo diferentes cepas de *S. aureus*, sino diferentes adyuvantes, vías y regímenes de inoculación. Algunos autores utilizaron la vía intramamaria (Brock *et al.*, 1975; Nonnecke *et al.*, 1986; Fitzpatrick *et al.*, 1992); intramuscular (Brock *et al.*, 1975; Schultze y Paape), o subcutánea en la región de los ganglios supramamarios (Nickerson *et al.*, 1993) u otras áreas anatómicas como el músculo braquiocefálico del cuello (Giraudó *et al.*, 1997). 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), e hidróxido de aluminio (Lee *et al.*, 2005).

En el presente estudio, el grupo vacunado en el área supramamaria, mostró títulos de IgG total en suero sanguíneo significativamente superiores a los obtenidos por inoculación en la tabla del cuello. 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 con una bacterina tipo CP2 adyuvada con sulfato de dextran, comparado con animales inmunizados con el mismo inmunógeno por vía intramamaria. 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 incluidos en el

inmunógeno. 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 distintos, 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 (Nickerson *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).

VI-CONCLUSIONES

VI-CONCLUSIONES

Objetivo N°1

Se determinó el genotipo capsular de 157 cepas de *S. aureus* aislados de leche bovina de vacas en cuatro de las principales provincias lecheras de la Argentina. El 64% de los aislamientos poseía segmentos de *cap5* y *cap8*, lo cual resalta la importancia de incluir estos componentes para el diseño racional de vacunas para mastitis. La prevalencia de los serotipos CP5 y CP8 (32,2%), fue más baja que la reportada previamente en otros países, pero fue similar a los estudios realizados en Argentina. Aunque el CP5 fue el genotipo más frecuente, las diferencias en la distribución de los genotipos entre las provincias no fueron significativas.

Objetivo N°2

Se utilizó una bacterina del tipo CP5, considerado el más prevalente en aislamientos de *S. aureus* en Argentina, formulada con hidróxido de aluminio como adyuvante. La inoculación de esta bacterina 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 placebo, aunque no se detectaron diferencias entre ambas vías.

VII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- * ADLAM, C., KERRY, J.B., EDKINS, S. and WARD, P.D. 1981. Local and systemic antibody responses in cows following immunization with staphylococcal antigens in the dry period. *J. Comp. Pathol.*91:105.
- * ADLAM, C. and EASMON, C.S.F. 1983. Immunity and hipersensitivity to Staphylococcal infection. In: *Staphylococci and Staphylococcal infections*. Pp.275-323. Academic Press.
- *AGRANOFF, D. D. and S. KRISHNA. 1998. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol. Microbiol.* 28: 403-412.
- * AGUILAR, B., AMORENA, B.; and ITURRALDE, M. 2001. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 78: 183-191.
- * AHMED, S., MEGHJI, S.; WILLIAMS, R.J.; HENDERSON, B.; BROCK, J.H. and NAIR, S.P. 2001. *Staphylococcus aureus* fibronectin binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but do not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect. Immun.* 69: 2872-2877.
- *AKINEDEN, Ö., ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W. and ZSCHOÖCK, M. 2001. Toxin genes and other characteristics of

Staphylococcus aureus isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab Immunol, 8: 959-964.

* ALBUS, A., R.D. ARBEIT and J.C. LEE. 1991. Virulence of *Staphylococcus aureus* mutants altered in type 5 capsule production. Infect. Immun. 59: 1008-1014.

*ALLISON, J.P. and HAVRAN, W. 1991. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta receptors. Annu. Rev. Immunol. 9:679-705.

* ALLUWAIMI, A.M. 2000. Detection of IL-2 and IFN-gamma mRNA expression in bovine milk cells at the late stage of the lactation period with RT-PCR. Res. Vet. Sci. 69:185-187.

* ALLUWAIMI, A.M.; CULLOR, J.S. 2002. Cytokines gene expression patterns of bovine milk during mid and late stages of lactation. J. Vet. Med. B. 49:105-100.

* ALLUWAIMI, A. M.; ROSSITO, P.V.; LEUTENEGGER, C.M.; FARVER, T.B.; SMITH, W.L.; CULLOR, J.S. 2003. The cytokines marker in the *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. J. Vet. Med. B. 50:105-111.

* ALLUWAIMI, A.M. 2004. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. Res. Vet. Sci. 77:211-222.

- * ALMEIDA, R. A., MATTHEWS, K.R.; CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J. and OLIVER S.P. 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci, 79: 1021-1026.
- * ALVES, P.D.; MC CULLOCH, J.A.; EVEN, S.; LE MARÉCHAL,C.; THIERRY, A.; GROSSET, N.; AZEVEDO, V.; ROSA, C.A.; VAUTOR, E. and LE LOIR, Y. 2009 Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. Vet. Microbiol. 137, 190-195.
- * ALY, R. and LEVIT, S. 1987. Adherence of *S. aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. Rev. Infect. Dis. 9:S342-S350.
- * AMMENDOLIA, M.G., DI ROSA, R., MONTANARO, R., ARCIOLA, C.R., BALDASSARRI, L. 1999. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. J.Clin.Microbiol, 37:3235-3238.
- * AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J.; HERNÁNDEZ, L and YAGO, J.1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. J. Antimicrob. Chemother. 44:43-55.
- * ANDERSON, J.C. 1976. Mechanism of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. Br. Vet. J. 132: 229-245.

- * ANDERSON, J.C. 1978. The problem of immunization against staphylococcal mastitis. Br. Vet. J. 134:412-420.
- * ANDERSON, J.C. 1983. Veterinary aspects of Staphylococci. Pp. 193-241. In; Staphylococci and Staphylococcal infections. Vol. 1. C.S.F. Easmon and C. Adlam (eds.) Academic Press. London-New York.
- * ANDERSON, D.C.; SPRINGER, T.A. 1987. Leukocyte adhesion deficiency: An inherited defect in the MAC-1, LFA-1 and p150, 95 glycoproteins. Annu. Rev. Med. 38:175.
- * ARBEIT, R.D., KARAKAWA, W.W., VANN, W.F. and ROBBINS J.B. 1984. Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolated of *Staphylococcus aureus*. Diagn. Microbiol. Infect.Dis 2:85-91
- * ARBEIT, R.D. and DUNN R.M., 1987. Expression of capsular polysaccharide during experimental focal infection with *Staphylococcus aureus*. J.Infect. Dis. 156:947-952.
- * ARBEIT, R.D., and NELLES, M.J. 1987. Capsular polysaccharide antigenemia in rats with experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. J. Infect. Dis. 155: 242-246.

- * ARIZONO, T., UMEDA, A. and AMAKO, K.1991. Distribution of capsular materials on the cell wall surface of strain Smith diffuse of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 173: 4333-4340.
- * ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. 2007. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. Mem. Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 102 (1):29-33.
- * ARVIDSON, S. AND TEGMARK, K. 2001. Regulation of virulence determinants in *S. aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 29:159-170.
- * ASAI, K.; KAI, K.; RIKIISHI, H.; SUGAWARA, S.; MARUYAMA, Y.; YAMAGUCHI, T.; OHTA, M.; KUMAGAI, K. 1998. Variation in CD4C T and CD8C T lymphocyte subpopulations in bovine *aureus* infections with recombinant cytokines. Cytokine 5:276-283.
- * BAILEY, C. J.; LOCKHART, B.P.; REDPATH, M.B. and SMITH, T.P. 1995.The epidermolytic (exfoliative) toxins of *Staphylococcus aureus*. Med. Microbiol. Immunol. (Berl), 184: 53-61.
- * BANTEL, H.; SINHA, B.; DOMSCHKE, W.; PETERS, G.; SCHULZE-OSTHOFF, K. and JANICKE, R.U.2001. Alpha- toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. J. Cell. Biol. 155: 637-648.

- * BASELGA, R, ALBIZU, I.; DELACRUZ, M, DEL CACHO, E.; BARBERAN, M. and AMORENA, B. 1993. Phase variation of slime production in *S. aureus*. Implications in colonization and virulence. *Infect. Immun.* 61: 4857-4862.
- * BASELGA, R., ALBIZU, I. and AMORENA, B. 1994. *S. aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminants. *Vet. Microbiol.* 39:195-204.
- * BAYLES, K. W.; WESSON, C.A.; LIOU, L.E.; FOX, L.K.; BOHACH, G.H. and TRUMBLE, W.R.1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*, 66: 336-342
- * BEDOLLA, C.C. and PONCE DE LEÓN, M.E.R. 2008. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. REDVET Vol. IX, Nº 4 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040805.pdf>
- * BERTOTTO, A.; GERLI, R.; FABIETTI, G.; CRUPI, S.; ARCANGELI, C.; SCALISE, F.; VACCARO, R. 1990. Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 8:1877-1880.
- * BEUTLER, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40:845-859.
- * BHAKDI, S. and TRANUM-JENSEN, J. 1991. Alpha toxin of *S. aureus*. *Microbiol. Rev.* 55: 733-751.

* BHAKDI, S.; BAYLEY, H.; VALEVA, A.; WALEY, I.; WALKER, B.; KEHOE, M. and M. PALMER. 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. Arch. Microbiol. 165: 73-79.

* BISHOP, J.G.; SCHANBACHER, F.L.; FERGUSON, L.C.; SMITH, K.L. 1976. *In vitro* growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apolactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apolactoferrin. Infect. Immun. 14:911-918.

* BLOSSER, T.H. 1979. Economic losses from and National Research Program on mastitis in the United States. J. Dairy Sci. 63:487.

* BOOTH, J.M., 1975. Mastitis control in the field: some results of two large field trials: pp. 19-31. Proc Natl. Mastitis Council, Arlington, VA.

* BOOTH, J.M. 1981. The importance of udder health in relation to milk quality improvement and control. Milk Quality Improvement and Control. Eds. J.D. Collins and J. Hannan. University College Dublin. pp. 1-11.

* BRAMLEY, A. J., and DODD, F. H. 1984. Mastitis control progress and prospects. J. Dairy Res. 51:481-512.

- * BRAMLEY, A.J.; PATEL, A.H.; O'RELLY, M.; FOSTER, R. and FOSTER, T.J. 1989. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *S. aureus* for the mouse mammary gland. *Infect. and Immun.* 57: 2489-2494.
- * BRAMLEY, A J. and DODD, F.H. 1994. Mastitis control: progress and prospects. *J Dairy Sci.* 51:481.
- * BRAMLEY, A.J., CULLOR, J.S., ERSKINE, R.J., FOX, L.K., HARMON, R.J., HOGAN, J.S., NICKERSON, S.C., OLIVER, S.P., SMITH, K.L., and SORDILLO, L.M. 1996. "Current Concepts of Bovine Mastitis," 4th ed. National Mastitis Council, Madison, WI.
- * BRANDA, S.S., VIK, S., FRIEDMAN, L. KOLTER, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13:20-26.
- * BROCK, J.H.; STEEL, E.D. and REITER, B. 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
- * BROUILLETTE, E.; LACASSE, P.; SHKRETA, L.; BELANGER, J.; GRONDIN, G.; DIARRA, M.S.; FOURNIER, S. and TALBOT, B.G. 2002. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 20, 2348-2357.

* BROUILLETTE, E.; GRONDIN, G.; SHKRETA, L.; LACASSE, P. and TALBOT, B.G. 2003. In vivo and in vitro demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Pathog*, 35: 159-168.

* BROWN, W.C.; RICE-FICHT, A.C.; ESTES, A.C.; ESTES, D.M. 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63:45-55.

* BUSTOS-MARTÍNEZ, J.A.; HADMAN-PARTIDA, A. and GUTIERREZ-CÁRDENAS, M. 2006. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 17:287-305.

* CABISCOL, E., TAMARIT, J. and ROS, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 3: 3-8.

* CAI, T.Q.; WESTON, P.G.; LUND, L.A.; BRODIE, B.; MC KENNA, D.J.; WAGNER, W.C. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J.Vet. Res.* 55:934-943.

* CALVINHO, L.F. and 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.

* CAPUCO, A.V.; PAAPE, M.J. and NICKERSON, S.C. 1986. In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissue of lactating cows. Am. J. Vet. Res. 47:663.

* CAPUCO, A. V.; BRIGHT, S.A.; PANKEY, J.W., WOOD, D.L; MILLER, R.H. and BITMAN J. 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. J Dairy Sci. 75:2126.

*CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.; OLIVEIRA, J.; MUÑOZ-BERROCAL, M. and JURADO-GÁMEZ, H. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. J. Dairy Sci. 85:2885-2889.

* CHEUNG, A. L., BAYER, A.S.; ZHANG, G.; GRESHAM, H. and XIONG, J.Q. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol, 40: 1- 9.

* CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L. and BEACHEY, E.H. 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. 37:318-326.

* CHRISTNER, R. B. and BOYLE, M.D. 1996. Role of staphylokinase in the acquisition of plasmin(ogen)- dependent enzymatic activity by staphylococci. J Infect Dis, 173: 104-112.

* CIFRIAN, E.A.; GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N. and MARQUARDT, W.W. 1995. Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence of *S.aureus* to cultured teat, ductular and secretory mammary epithelial cells. Res. in Vet. Sci. 58: 20-25.

* CIFRIAN, E.A.; GUIDRY, A.J.; BRAMLEY, A.J.; NORCROSS, N.L.; BASTIDA-CORCOURERA, F.D. and MARQUARDT, W.W. 1996. Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *S. aureus* to bovine mammary epithelial cells. Vet. Microbiol. 48:187-198.

* COCCHIARO, J.L.; GOMEZ, M.I.; RISLEY, A.; SOLINGA, R.; SORDELLI, D.O. and LEE, J.C. 2006. Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology 59 (3):948-960.

* COHN, Z. 1962. Determinants of infection in the peritoneal cavity. 1. Response to and fate of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* in the mouse. Yale J. Biol. Med. 35:12-28.

* COLDITZ, I.G., and WATSON, D.L. 1985. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. Aust. Vet. J. 62:145-153.

* COLEMAN, D. C., ARBUTHNOTT, J.P.; POMEROY, H.M. and BIRKBECK, T.H. 1986. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage

conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. *Microb. Pathog.* 1: 549-564

* COSTERTON, J.W.; IRVIN, RTAND CHENG K-J. 1981. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *CRC critical Reviews in microbiology.* 8:303-338.

* COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL DE KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev. Microbiol.* 49:711-745.

* COSTERTON J.W., STEWART P.S. and GREENBERG, E.P. 1999. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science*; 284:1318-1322.

* COSTERTON, J.W., GRACIA, E.; FERNÁNDEZ, A.; CONCHELLO, P.; ALABART, J.L.; PÉREZ, M.; AMORENA, B. 1999. In Vitro development of *Staphylococcus aureus* biofilms using slime-producing variants and AT P - bioluminescence for automated bacterial quantification. *Luminescence.* 14 (1): 23-31.

* CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL,N.F.; NICHOLS, W.W.; AND GÖTZ, F. 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67:5427-5433.

* CRAVEN, N. and WILLIAMS M.R. 1985. Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet. Immunol. Immunopathol.*10:71.

* CRIST, W.L.; HARMON, R.J.; O'LEARY, J.; MCALLISTER, A.J. 1997. Mastitis and its control. Educational programs of the Kentucky Cooperative Extension Service, University of Kentucky College of Agriculture. P. 13.

* CUCARELLA, C., SOLANO, C., VALLE, J., AMORENA, B., LASA, I., PENADÉZ, J.R.; 2001. *Bap*, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183: 2888-2896.

* CUCARELLA, C., TORMO, M. A., KNECHT, E., AMORENA, B., LASA, I., FOSTER, T. J., and PENADÉS, R. J. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.* 70: 3180-3186.

* CUCARELLA, C., TORMO, M.A., UBEDA, C., TROTONDA, M.P., MONZÓN, M., PERIS, C., AMORENA, B., LASA, I., and PENADÉS, J.R. 2004. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 72: 2177-2185.

* CULLOR, J.S.; FAIRLEY, N.; SMITH, W.L.; WOOD, S.L.; DELLINGER, J.D.; INOKUM, M.S.; SOUZA, I.M. 1990. Hemogram changes in lactating dairy cows

given human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Vet. Pathobiol.* 27:311-316.

* CUNNION, K.M., LEE, J.C., and FRANK, M.M. 2001. Capsule production and growth phase influence binding of complement to *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69: 6796-6803.

* CUNNION, K.M.; ZHANG, H.M. and 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(2):656-662.

* DALEY, M.J.; WILLIAMS, T.; DOUGHERTY, R.; FURDA, G.; HAYES, P.; COYLE, P. 1993 Prevention and therapy of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine* 5:276-283.

* DARNELL, J.; LODISH, H. and BALTIMORE, D. 1990. Transport across cell membranes. In: *Molecular cell biology.* Scientific American Book New York. P.531-583.

* DASSY, B., STRINGFELLOW, W.T., LIEB, M. and FOURNIER, J.M. 1991. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semisynthetic medium. 1991. *J.Gen.Microbiol.* 137: 1155-1162.

- * DASSY, B. and FOURNIER, J.M.1996. Respiratory activity is essential for post-exponential-phase production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 64: 2408-2414.
- * DAVENPORT, D.S.; MASSANARI, R.M.; PFALLER, M.A.; BALE, M.J.; STREED, S.A. and HIERHOLZER, Jr. W.J. 1986. Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. J. Infect. Dis. 153:332-339.
- * DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64:847-867.
- * DENIS, M., WEDLOCK, D.N., LACY-HULBERT, S.J., HILLERTON, J.E., BUDDLE, B.M. 2009. Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: What is the best way forward? N.Z. Vet. J. 57, 132-140.
- * DETILLEUX, J.C.; KEHRLI, M.E; STABEL J.R.; FREEMAN, A.E, and KELLEY, D.H. 1995. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. Vet Immunol. Immunopathol. 44: 251-267.
- * DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M. 2000 Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev.13:16-34.

* DUBOIS, M. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and related Substances". Anal.Chem. 28:530

* DZIEWANOWKA, K., PATTI, J.M., DEOBALD, C.F., BAYLES, K., TRUMBLE, W.R. and G. A. BOHACH. 1999. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect Immun, 67: 4673-4678.

* DZIEWANOWKA, K., CARSON, A.R., PATTI, J.M., DEOBALD, C.F., BAYLES, K.W. and G. A. BOHACH. 2000. Staphylococcal fibronectin binding protein interacts with heat shock protein 60 and integrins: role in internalization by epithelial cells. Infect Immun, 68: 6321-6328.

* FATTOM, A., SCHNEERSON, R., SZU, S.C., VANN, W.F., SHILOACH, J., KARAKAWA, W.W. and ROBBINS, J.B. 1990. Synthesis and immunologic properties in mice of vaccines composed of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharides conjugated to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxina. A. Infect. Immun. 58:2367-2374.

* FERNÁNDEZ BOTRAN, R.; CHILTON, P.M.; MA, Y. 1996 Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease and therapy. Adv. Immunol. 63:269-336.

- * FITZPATRICK, J.L.; CRIPPS, P.J.; HILL, A.W., BLAND, P.W.; STOKES, C.R. 1992. MHCclass II expression in the bovine mammary gland. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32:13-23.
- * FOSTER, T.J.1991.Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 9:221-227.
- * FOSTER, T. J. and HÖÖK, M. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 6: 484-488.
- * FOSTER, T. J. and BOHACH, G.A. 2000. *Staphylococcus aureus* exotoxins Gram positive pathogens (V.Fischetti, R. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy and J. I. Rood). pp: 367-378. ASM Press.
- * FOURNIER,C.; KUHNERT, P.; FREY, J.;MISEREZ, R.;KIRCHHOFER, M.; KAUFMANN, T.; STEINER, A. and GRABER, H.U. 2008. Bovine *Staphylococcus aureus*: Association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. *Res. in Vet. Sci.* Vol 85 (3) 439-448.
- * FOWLER, T., E. R. WANN, D. JOH, S. JOHANSSON, T. J. FOSTER and M. HÖÖK. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur. J. Cell. Biol.* 79: 672-679.

- * FOX, K.F., STEWART, G.C. and FOX, A., 1998. Synthesis of microcapsule by *Staphylococcus aureus* is not responsive to environmental phosphate concentrations. Immunology 66:4004-4007.
- * FRASER, J, ARCUS, V; KONG, P; BAKER, E.; PROFT, T. 2000. Superantigens, powerful modifiers of the immune system. Mol. Med. Today. 6:125-132.
- * GEMMELL, C. G., TREE, R., PATEL, A., O'REALLY, M. and FOSTER, T.J. 1990. Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A, alpha-haemolysin and beta-toxin deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele-replacement. Zentralbl Bakteriol. 21: 273 277.
- *GILBERT, I. 1931. Dissociation in an encapsulated *staphylococcus*. J. Bacteriol. 21:157-160.
- * GILBERT, F.B., POUTREL, B. and SUTRA, L. 1994. Immunogenicity in cows of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharide-ovoalbumin conjugate. Vaccine. 12:369-374
- * GIRAUDO, J.A., CALZOLARI, A., RAMPONE, H., RAMPONE, A., GIRAUDO, A.T., BOGNI, C., LARRIESTRA, A., and NAGEL, R. 1997. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. J. Dairy Sci. 80:845-853.

* GRACIA, E.; FERNÁNDEZ, A.; CONCHELLO, P.; ALABART, J.L.; PÉREZ, M.; AMORENA, B. 1999. In vitro development of *Staphylococcus aureus* biofilms using slime-producing variants and ATP-bioluminescence for automated bacterial quantification. *Luminescence*; 14 (1) 23-31.

* GRESHAM, H. D., J. H. LOWRANCE, T. E. CAVER, B. S. WILSON, A. L. CHEUNG and F. P. LINDBERG. 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol (Baltimore, Md.: 1950)*, 164: 3713-3722.

* GROMMERS, F.J.; VAN DE GEER, D.; VAN DE VLIET, H.; HENRICKS, P.A. and NIJKAMP, F.P. 1989. Polymorphonuclear leukocyte functions: relationship between induced migration into the bovine mammary gland and in vitro cell activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23:75.

* GUIDRY, A.J. and MILLER, R.H. 1986. Immunoglobulin isotype concentrations in milk as affected by stage of lactation and parity. *J. Dairy Sci.* 69:1799-1805.

* GUIDRY, A.J., OLIVER, S.P., SQUIGGINS, K., ERBE, E.F. DOWLEN, H.H., HAMBLETON, C.N., and BERNING, L.M.. 1991. Effect of anticapsular antibodies on neutrophil phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 74:3360-3369.

* GUIDRY, A.J.; O'BRIEN, C.N.; OLIVER, S.P.; DOWLEN, H.H. and DOUGLAS, L.W. 1994. Effect of whole *Staphylococcus aureus* and mode of

immunization on bovine opsonizing antibodies to capsule. J.Dairy Sci. 77: 2965-2974.

* GUIDRY, A., FATTOM, A., PATEL, A., and O'BRIEN C. 1997. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. Vet. Microbiol. 59: 53-58.

* HAMILL, R. J., VANN, J.M., and PROCTOR, R.A., 1986. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. Infect. Immun. 54: 833-836.

* HAN, H.R.; PAK, S. 2nd and 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. J Vet Med Sci 62, 1331-1333.

* HARMON, R.J. and HEALD, C.W. 1982. Migration of polymorphonuclear leukocytes into bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. Am. J. Vet. Res. 43:992.

* HARTLEIB, J., KOHLER, N., DICKINSON, R.B., CHHATWAL, G.S., SIXMA, J.J., HARTFORD, O.M., FOSTER, T.J., PETERS, G., KEHREL, B.E. and HERRMANN, M. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. Blood. 96: 2149-2156.

* HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWA, T.; ENDO, T. and EGUCHI, M. 2006. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *J.Vet.Med.Sci.* 68 (2): 165-170.

* HAVERI, M.; TAPONEN, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; SALMENLINNA, S. and PYÖRÄLÄ, S. 2005. Bacterial Genotype Affects the Manifestation and Persistence of Bovine *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection. *J. Clin. Microbiol.* 43(2): 959–961.

* HÉBERT, A., SAYASITH, K., SÉNÉCHAL, S., DUBREUIL, P. and J. LAGACÉ. 2000. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 193: 57-62.

* HEINE, H. and LIEN, E. 2003. Toll-like receptor and their function in innate and adaptativa immunity. *Int. Arch.Allergy Immunol.* 130:180-192.

* HENSEN, S.M.; PAVICIC, M.J.; LOHUIS, J.A.; POUTREL, B. 2000. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *S. aureus* strain. *J. Dairy Sci.* 83:418-429.

* HENSEN, S.M.; PAVICIC, M.J.; LOHUIS, J.A.; DE HOOG, J.A., POUTREL, B. 2000. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. J. Dairy Sci. 83, 1966-1975.

* HERBELIN, C., POUTREL, B., GILBERT, F.B. and RAINARD, P. 1997. Immune recruitment and bactericidal activity of neutrophils in milk of cows vaccinated with staphylococcal toxin. J. Dairy Sci. 80:2025-2034.

* HERBERT, S., WORLITZSCH, D., DASSY, B., BOUTONNIER, A., FOURNIER, J.M., BELLON, G., DALHOFF, A. and DORING, G. 1997. Regulation of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5: CO₂ inhibition in vitro and in vivo. J. Infect. Dis. 176:431-438.

* HERBERT, S., NEWELL, S.W., LEE, C., WIELAND, K.P., DASSY, B., FOURNIER, J.M., WOLZ, C. and DORING, G. 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 and type 8 capsular polysaccharide by CO₂. J. Bacteriol. 183: 4609-4613.

* HERZER, C.M. 2001. Toxic shock syndrome: broadening the differential diagnosis. J. Am. Board. Fam. Pract. 14:131-6.

- * HESS, D. J., HENRY-STANLEY, M.J., ERICKSON, E.A., and WELLS, C.L. 2003. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. J. Surg. Res. 114: 42-49.
- * HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C. 1992. Kinetics and characteristics of bovine neutrophil alkaline phosphatase during acute *Escherichia coli* mastitis. J. Dairy Sci. 75(7):1826-1834.
- * HIBBIT, K.G.; COLE, C.B. and REITER, B. 1969. Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. J. Gen. Microbiol. 56:365.
- * HIBBIT, K.G.; CRAVEN, N. and BATTEN, E.H. 1992. Anatomy, physiology, and immunology of the udder. Page 273 in Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of cattle. Ed. Blackwell Sci. Publ. St. Louis, MO.
- * HILLERTON, J.E.; WALTON, A.W. 1991. Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter. Vet Rec. 128:513-525.
- * HOCHKEPPEL, H.K.; BRAUN, D.G, VISCHER, W., IMM, A., SUTTER, S., STAEUBLI, U., GUGGENHEIM, R., KAPLAN, E.L., BOUTONIER, A. and FOURNIER, J.M. 1987. Serotyping and electron microscopy studies of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8. J. Clin. Microbiol. 25:526-530.

- * HOGAN, J.S.; HARMON, R.J.; GONZÁLEZ, R.N.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. National Mastitis Council, Madison, WI. Pg.222.
- * HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J.T.; BLOKHUIS, H.J. 1998. Stress enhanced reduction in peripheral blood lymphocyte numbers in dairy cows during endotoxin-induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66:83-97.
- * HUDSON, M. C., RAMP, W.K., NICHOLSON, N.C., WILLIAMS, A.S., and NOUSIAINEN, M.T. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog.* 19: 409-419.
- * HURST, J. K. and BARRETTE, W.C. Jr. 1989. Leukocytic oxygen activation and microbicidal oxidative toxins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24: 271-328.
- * HWANG, C.Y.; PAK, S.I. and HAN, H.R. 2000. Effects of autogenous toxoid-bacterin in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 875-880.
- * ISMAIL, H.I.; HASHIMOTO, Y.; KON, Y.; OKADA, K.; DAVIS, W.C.; IWANAGA, T. 1996. Lymphocyte subpopulations in the mammary gland of the goat. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52:201-212.

- * ITO, T. and KODAMA, M. 1996. Demonstration by reverse transcription-polymerase chain reaction of multiple cytokine mRNA expression in bovine alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Res. Vet. Sci.* 60:94-96.
- * JAIN, N.C. 1976. Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland. *Theriogenology* 6:153-173.
- * JANEWAY, C.A. Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 54:1-13.
- * JEVON, M., GUO, C.; MA, B.; MORDAN, N.; NAIR, S.P.; HARRIS, M.; HENDERSON, B.; BENTLEY, G. and MEGHJI, S. 1999. Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. *Infect. Immun.* 67: 2677-2681.
- * JIN, T., BOKAREWA, M., FOSTER, T., MITCHELL, J., HIGGINS, J. and TARKOWSKI, A. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J. Immunol.* 172: 1169-1176.
- * JOHNE, B. J. and HAAHEIM, L.R. 1989. *Staphylococcus aureus* exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* 27:1631.

* JONAS, D., WALEV, I., BERGER, T., LIEBETRAU, M., PALMER, M. and BHAKDI, S.1994. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect Immun.* 62: 1304-1312.

* JONES, G.M. 1998. Mastitis cost? Dairy Pipeline: Virginia Cooperative Extension. Virginia Polytechnic Institute and State University. Actualization 7 of November 2002. <http://www.dasc.vt.edu/jones/mastcost.htm>.

* KAHL, B. C., GOYLIAN, M., VAN WAMEL, W., HERRMANN, M., SIMON, S.M., KAPLAN, G., PETERS, G. and CHEUNG, A.L. 2000. *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line. *Infect Immun.* 68: 5385-5392.

* KAISHO, T. and AKIRA, S. 2006. Toll-like receptor function and signaling, *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:979-987.

* KAMPEN, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. 2005. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide Types 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils *In vitro*. *Infect. Immun.* 73: 1578-1583.

* KARAKAWA, W.W.; VANN, W.F.1982.Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semin. Infect. Dis.* 4: 285-293.

- * KARAKAWA, W.W., FOURNIER, J.M., VANN, W.F., ARBEIT, R., SCHNEERSON, R.S., and ROBINS, J.B. 1985. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 22:445-447.
- * KARAKAWA, W.W.; SUTTON, A.; SCHNEERSON, R.; KARPAS, A. and VANN, W.F. 1988. Capsular antibodies induce type-specific phagocytosis of capsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 56: 1090-1095.
- * KEHRLI Jr., ME, NONNECKE, B.J.; ROTH, J.A. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. Am. J. Vet. Res. 50:207-214.
- * KEHRLI, M.E., BURTON, J.L.; NONNECKE, B.J.; LEE, E.K. 1999. Effects of stress on leukocyte trafficking and immune responses: Implications for vaccination. Adv. Vet. Med. 41:61-81.
- * KENNY, K.; REISER, R.F.; BASTIDA-CORCUERA, F.D. and NORCROSS, N.L. 1993. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *S. aureus*. J.of Clin. Microbiol. 31: 706-707.
- * KERR, D.E.; PLAUT, K.; BRAMLEY, A.J.; WILLIAMSON, C.M.; LAX, A.J. and MOORE, K. 2001. Lysostaphin expression in mammary glands confers

protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nat. Biotec. 19: 66-70.

* KERRO DEGO, O.; VAN DIJK, J.E. and NEDERBRAGT, H. 2002. Factor involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. Vet. Quart. 24(4):181-198.

* KLOSS, W.E. and BANNERMAN, T.L. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol Rev 7: 117-140.

* KOENING, M.G. 1962. Factors relating to the virulence of staphylococci. I. Comparative studies on two colonial variants. Yale J. Biol. Med. 34:537-559.

* KUUSELA, P. and SAKSELA, O. 1990. Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*. Increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. Eur J Biochem. 193: 759-765.

* LANDMANN, R.; LUDWING, C.; OBRIST, R.; OBRECHT, J.P. 1991. Effect of cytokines and lipopolysaccharide on CD14 antigen expression in human monocytes and macrophages. J. Cell. Biochem. 47:317-325.

* LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R. and JENSEN, N.E. 2000. Different between Danish bovine and human *S. aureus* isolates in possession of superantigens. Vet. Microbiol. 76:153-162.

* LARSEN, H. D., AARESTRUP, F.M., and 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

* LASA, I.; DEL POZO, L.; PENADÉS, J.R.; LEIVA, J.; 2005. Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* Vol. 28, N°2.

* LEE, C.S.; WOODING, F.P.B. and KEMP, P. 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.* 47:39.

* LEE, J.C., LIU, M.J., PARSONNET, J. and ARBEIT, R.D. 1990. Expression of type-8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin-1 are associated among vaginal isolated of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 28:2612-2615.

* LEE J.C., TAKEDA, S., LIVOLSI, P.J. and PAOLETTI, L.C. 1993. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 61: 1853-1858.

* LEE, E.K.; KEHRLI, M.E.Jr. 1998. Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves. *Am. J. Vet. Res.* 59:37-43.

* LEE, J.W.; PAAPE, M.J.; ELASSER, T.H.; ZHAO, X. 2003. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. J. Dairy Sci. 86:2382-2389. Can. J. Vet. Res. 69 (1): 11–18.

* LEE, J.W.; O'BRIEN, C.N.; GUIDRY, A.J.; PAAPE, M.J., SHAFER-WEAVER, K.A. and ZHAO, X. 2005. Effect of a trivalent vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis lymphocyte subpopulations, antibody production, and neutrophil phagocytosis. Can. J. Vet. Res. 69 (1):11-8.

* LEITNER, G., LUBASHEVSKY, E., NACHMEAS, E., GLICKMAN, A., WINKLER, M., SARAN, A., and TRAININ, Z. 2000. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows: animal model, field trials and therapeutic effect. In: Proc. IDF Symposium of Immunology of Ruminant Mammary Gland. Stressa. A Zeconi (ed.). Pg. 418-425.

* LEITNER, G., LUBASHEVSKY, E., GLICKMAN, A., WINKLER, M., SARAN, A., and TRAININ, Z. 2003a. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. Vet. Immunol. Immunopathol. 93: 31-38.

* LEITNER, G., YADLIN, N., LUBASHEVSKY, E., EZRA, E.; GLICKMAN, A.; CHAFFER, M.; WINKLER, M., SARAN, A., and TRAININ, Z. 2003b. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. Vet. Immunol. Immunopathol. 93, 153-158.

- * LEMBERG, R. and J.LEGGE, J.W. 1949. Hematin compounds and bile pigment. pp: 415-444. Interscience. New York.
- * LINDAHL, M.; HOLMBERG, O. AND JONSSON, P. 1990. Adhesive proteins of haemagglutinating *S. aureus* isolated from bovine mastitis. J. of Gen. Microbiol. 136:935-939.
- * LINDSAY, J. A. and FOSTER, S.J.1999. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. Mol. Gen. Genet. 262: 323-331.
- * LOEFFLER, D.A.; SCHAT, K.A. and NORCROSS, N.L. 1986. Use of Cr 51 release to measure the cytotoxic effects of staphylococcal leukocidin and toxic neutralization on bovine leucocytes. J. of Clin. Microbiol. 23: 416-420.
- * LOTTENBERG, R., MINNING-WENZ, D. and BOYLE, M.D. 1994. Capturing host plasminogen: a common mechanism for invasive pathogens? Trends Microbiol, 2: 20-24.
- * LOW, D.K.R.; FREER, J.H. 1977. Biological effects of highly purified B-lysin (sphingomyelinase) from *S. aureus*. FEMS letters. 2:133-138.

- * LUONG, T. T. and LEE, C.Y. 2002. Overproduction of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. *Infect Immun*, 70: 3389-3395.
- * MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J.K.; ELSNER, H.A. and FEUCHT, H.H. 2000. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* 68:3799-3807.
- * MAGNUSSON, U. 1999. Longitudinal study of lymphocyte subsets and major histocompatibility complex-class II expressing cells in mammary glands of sows. *Am. J. Vet. Res.* 60:546-548.
- * MAH, T.F. and O'TOOLE, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends. Microbiol.* 9:34-39.
- * MAH J, COCCHIARO J, LEE, J.C. 2004. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J Dairy Sci.* 87, 178–182.
- * MALISZEWSKI, C.D.; WRIGHT, S.D. 1991. CD14 and immune response to lipopolysaccharide. *Science.* 252:1321-1322.

* MALLARD, B.A.; DEKKERS, J.C.; IRELAND, M.J.; LESLIE, K.E.; SHARIF, S.; VAN KAMPEN, C.L.; WAGTER, L.; WILKIE, B.N. 1998. Alteration in immune responsiveness during the 136 peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J. Dairy Sci.* 81:585-595.

* MAMO, W.; ROZGONYI, F.; HJERTBN, S. and WADSTRISM, T. 1987. Effect of milk on surface properties of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Fed. Eur. Microbiol. SOC. Microbiol. Lett.* 48:195.

* MAMO, W. and FROMAN, G. 1994. In vivo-like antigenic surface properties of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis induced upon growth in milk whey. *Microbiol. Immunol.* 38:801-804.

* MARTÍNEZ PULGARÍN, S.; 2005. Influencia de la catalasa y de la β -toxina en la patogénesis de *Staphylococcus aureus*. Tesis. Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. N° pág. 127. ISBN: 84-669-2854-5.

* MASSEY, R. C., KANTZANOU, M.N.; FOWLER, T.; DAY, N.P.; SCHOFIELD, K.; WANN, E.R.; BERENDT, A.R.; HOOK, M. and PEACOCK, S.J. 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell. Microbiol.* 3: 839-851.

- * MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KAKIICHI, N. and UCHIDA, K. 1993. Characteristics of *S. aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. J.of Vet. Med. Sci. 55:297-300.
- * MATSUSHIMA, K.; OPPENHEIM, J.J. 1989. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. Cytokine. 1:2-13.
- * MC KENNEY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. Infect. Immun. 66 (10):4711-20.
- * MC KENNEY, D.; POULIOT, K.L.; WANG, Y.; MURTHY, V.; ULRICH, M.; DORING, G.; LEE, J.C.; GOLDMANN, D.A. and PIER, G.B. 1999. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. Science. 284: 1523-1527.
- * MC KENNEY, D.; POULIOT, K.L.; WANG, Y.; MURTHY, V.; ULRICH, M.; DORING, G.; LEE, J.C.; GOLDMANN, D.A. and PIER, G.B. 2000. Vaccine potential of poly-1-6 B-D-N- succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. J. Biotechnol. 83: 37-44.
- * MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. 1:135-145.

- * MELLEBERGER, R.W. 1977. Vaccination against mastitis. J. Dairy Sci. 60(6):1016-21.

- * MELLOR, I. R.; THOMAS, D.H. and SANSON, M.S. 1988. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. Biochim. Biophys. Acta. 942: 280-294.

- * MELLY, M.; DUKE, D.; LIAU F. and HASCH, J. 1974. Biological properties of the encapsulated *Staphylococcus aureus*. M. Infect. Immun. 10:389-397.

- * MENZIES, B. E. and KOURTEVA, I. 1998. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. Infect. Immun. 66: 5994-5998.

- * MENZIES, B. E. and KOURTEVA, I. 2000. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29: 39-45.

- * MIDDLETON, J.R. 2008. *Staphylococcus aureus* antigens and challenges in vaccines development. Expert Rev. Vaccines. 7 (6) 805-815.

- * MIESCHER, S.; SCHREYER, M.; BARRAS, C.; CAPASSO, C.; VON FLIERDNER, V. 1990. Sparse distributions of gamma delta T lymphocytes around human epithelial tumors predominantly infiltrated by primed memory T cells. Cancer Immunol. Immunother. 32:81-87.

- * MILLER, R.H.; GUNDRY, A.J.; PAAPE, M.J.; DULIN, A.M.; FULTON, L.A. 1988. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 49:42-45.
- * MOLDOVEANU, Z.; TENOVUN, J.; MESTECKY, J. and PRUITT, K.M. 1982. Human milk peroxidase is derived from milk leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 718:103.
- * MOND, J.; VOS, Q.; LEES, A. and SNAPPER, C.M.1995. T cell independent antigens. *Current op. immunol.* Vol 7 (3) 349-354.
- * MONDAY, S. R.; VATH, G.M.; FERENS, W.A.; DEOBALD, C.; J. V. RAGO, J.V.; GAHR, P.J.; MONIE, D.D.; IANDOLO, J.J.; CHAPES, S.K.; DAVIS, W.C.; OHLENDORF, D.H.; SCHLIEVERT, P.M. and BOHACH, G.A. 1999. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *J. Immunol.* 162: 4550-4559.
- * MONKS, J.; GESKE, F.; LEHMAN, L.; FADOK, V.A. 2002. Do inflammatory cells participate in mammary gland involution? *J. Mammary Gland Biol.* 7:163-176.
- * MUNCH-PETERSEN, E. 1938. Bovine mastitis: survey of the literature to the end of 1935. Weybridge: Imperial Bureau of Animal Health.

* MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S, KOBAYASHI, G.S, PFALLER, M.A. 2003. *Staphylococcus* y microorganismos relacionados. Microbiología médica. Cap. 22.198-212. 4ta edición. Elsevier.

* MUSOKE, A.J.; RURANGIRWA, F.R. and NANTULYA, V.M. 1987. Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. Page 393 in *The Ruminant Immune System in Health and Disease*. W.I. Morrison, ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England.

* NANRA, J.S.;TIMOFEYEVA, Y.; BUITRAGO, S.M.; SELLMAN, B.R., DILTS, D.A.;FINK, P.; NUÑEZ, L.; HAGEN, M.; MATSUKA, Y.V.; MININNI, T.; ZHU, D.; PAVLIAK, V.; GREEN, B.; JANSEN,K. and ANDERSON, A.S.2009. Heterogeneous *in vivo* expression of clumping factor A and capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*: Implications for vaccine design *Vaccine*. 27:3276-3280.

* NASH, D. L., ROGERS, G.W., COOPER, J. B., HARGROVE, G.L., KEOWN, J. F.2003. Heritability of Intramammary Infections at First Parturition and Relationships with Sire Transmitting Abilities for Somatic Cell Score,Udder Type Traits, Productive Life, and Protein Yield. *J Dairy Sci.*; 86:2684-2695.

* NELSON, L.; FLOCK, J.; HMK, M.; LINDBERG, M.; MÜLLER, H.P. and WADSTRISM, T. 1991. Adhesions in staphylococcal mastitis as vaccine components. *Hem. Vet. J.* 6:111-125.

- * NICKERSON, S.C., OWENS, W.E. and BODDIE, R.L. 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.
- * NICKERSON, S. C., OWENS, W.E.; TOMITA, G.M. and WIDEL, P.W. 1999. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. Large An. Pract. 20:16-28.
- * NICKERSON, S.C., OWENS, W.E. and BODDIE, R.L. 2000. Efficacy of a *S. aureus* mastitis vaccine in dairy heifers. In: Proc. IDF Symposium of Immunology of Ruminant Mammary Gland. Stressa. A Zeconi (ed.). p. 426-31.
- * NIEMIALTOWSKI, M.; NONNECKE, B.J.; TARGOWSKI, S.P. 1988. Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. J. Dairy Sci. 71:780-787.
- * NONNECKE, B.J.; ELSKEN, L.A and KEHRLI, M.E. Jr. 1986. Local and systemic immune response in the cow after intramammary vaccination during lactation. Vet. Immunol. Immunopathol. 11(1) 31-44.
- * NORCROSS, N. L. and OPDEBEECK, J.P. 1983. Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Vet. Microbiol. 8:397.

- * NORCROSS, N. L. 1991. Specific defense mechanisms of the udder. *Hem. Vet. J.* 62 :129-139.
- * NORDHAUG, M.L., NESSE, L.L., NORCROSS, N.L., and GUDDING, R. 1994. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J. Dairy Sci.* 77:1267-1275.
- * NOVICK, R. P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48: 1429-1449.
- * O'BRIEN, C. N.;GUIDRY, A.J.; FATTOM, A.; , SHEPHERD, S.; DOUGLAS, L.W.; and WESTHOFF, D. C. 2000. Production of Antibodies to *Staphylococcus aureus* Serotypes 5, 8 and 336 Using Poly (DL-Lactide-co-Glycolide) Microspheres. *J. Dairy Sci.* 83:1758–1766.
- * O'FLAHERTY, S., ROSS, R. P., FLYNN, J., MEANEY, W. J., FITZGERALD, G. F. y COFFEY, A. 2005. Isolation and characterization of two anti-staphylococcal bacteriophages specific for pathogenic *Staphylococcus aureus* associated with bovine infections. *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 482–486.
- * OKADA, H.; ITO, T.; OHTSUKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H.; YAMASHITA, K.; YOSHINO, T.; ROSOL, T.J. 1997. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cells *in vitro*. *J. Vet. Med. Sci.* 59:503-507.

- * OLIVER, S.P. and MITCHELL, B.A. 1983. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. J. Dairy Sci. 66:1162-1166.

- * OLIVER, S.P.; SORDILLO, L.M. 1988. Udder health in the periparturient period. J. Dairy Sci. 71:2584-2606.

- * OLIVER, S.P.; SORDILLO, L.M. 1989. Approaches to the manipulation of mammary involution. J. Dairy Sci. 72:1647-1664.

- * OLIVER, S.P. and CALVINHO, L.F. 1995. Influence of inflammation on mammary gland metabolism and milk composition. J. Anim. Sci. 73: 18-33.

- * OPDEBEECK, J.P. and NORCROSS, N.L. 1982. Antibody response in lacteal secretion of cows after immunization with various concentrations of staphylococcal and streptococcal antigens. Am. J.Vet. Res. 43:1770-1775.

- * O'RIORDAN, K. and LEE, J. C. 2004. *Staphylococcus aureus*. Capsular Polysaccharides. Clin Microbiol. Rev. p.218-234.

- * PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P. 1977. The leukocyte as a defense mechanism. J. Am. Vet. Med. Assoc. 15:1214-1223.

- * PAAPE, M.J.; WERGIN, N.T. and GUIDRY, A.J. 1981. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. Adv. Exp. Med. Biol. 137:555.

- * PAAPE, M.J.; MILLER, R.H.; YOUNG, M.D.; PETERS, R.R. 1992. Influence of involution on intramammary phagocytic defense mechanisms. *J. Dairy Sci.* 75:1849-1856.
- * PAAPE, M.J.; LILIUS, E.M.; WIITANEN, P.A.; KONTIO, M.P.; MILLER, R.H. 1996. Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. *Am J Vet Res.* 57:477-482.
- * PAAPE, M.J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A.V.; VAN OOSTVELDT, K.; BURVENICH, C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:259-277.
- * PAAPE, M.J.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J. and BURVENICH, C. 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7:109-121.
- * PARK, Y.H.; FOX, L.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C. 1992. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.* 75:998-1002.
- * PARK, Y.H.; FOX, L.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C. 1993. Suppression of proliferative responses of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 36:137-151.

* PEACOCK, S. J., FOSTER, T.J.; CAMERON, B.J. and BERENDT, A.R. 1999. Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology*, 145: 3477-3486.

* PEREZ-CASAL, J.; PRYSLIAK, T.; KERRO DEGO, O. and POTTER, A.A. 2006. Immune responses to a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potential use as a component of a vaccine for *S. aureus* mastitis. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 109: 85–97.

* PERSSON, K.; LARSSON, I.; HALLEN SANDGREN, C. 1993. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37:99-112.

* PERSSON WALLER, K. 2000. Mammary gland immunology around parturition: Influence of stress, nutrition and genetics. *Advances in Experimental Medicine Biology.* 48: 231 – 245.

* PERSSON- WALLER, K.; GOLDITZ, I.G.; LUN, S.; OSTENSSON, K. 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 74:31-36.

- * PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V. and HONKANEN-BUZALKI, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001- Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87: 2433-2441.
- * POHLMANN-DIETZE, P., ULRICH, M., KISER, K.B., DORING, G., LEE, J.C., FOURNIER, J.M., BOTZENHART, K. and WOLX C. 2000. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells. Influence of the capsular polysaccharide, the global regulator agr, and the bacterial growth phase. *Infect. Immun.* 68:4865-4871.
- * POLITIS, I.; ZHAO, X.; MC BRIDE, B.W.; BURTON, J.H. 1992. Function of bovine mammary macrophages as antigen presenting cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30:399-410.
- * POSPIECH, A. and NEUMANN, B 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends. Genet.* 11 : 217-218.
- * POUTREL, B.; BOUTONNIER, A.; SUTRA, L. and FOURNIER, J.M.1988. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. *J. Clin. Microbiol.* 26:38-40.
- * POUTREL, B., and SUTRA, L.1993. Type 5 and type 8 capsular polysaccharides are expressed by *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits, poultry, pigs, and horses. *J. Clin. Microbiol.* 31: 467-469.

- * POUTREL, B., GILBERT, F.B., and LEBRUN, M. 1995. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. Clin. Diagn. Lab Immunol. 2:166-171.
- * POUTREL, B.; RAINARD, P. and SARRADIN, P.1997. Heterogeneity of cell-associated CP5 expression on *Staphylococcus aureus* strains demonstrated by flow cytometry. Clin. Diag. Lab. Immunol. 4: 275-278.
- * PRADEEP VASUDEVAN, MANOJ KUMAR, MOHAN FAIR, HIRUNAVUKKARASU ANNAMALAI, KUMAR S., VENKITANARAYANAN . 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet. Microbiol. 92: 179-185.
- * QAZI, S. N.; COUNIL, E.; MORRISSEY, J.; REES, C.E.; COCKAYNE, A.; WINZER, K.; CHAN, W.C.; WILLIAMS, P.; and HILL, P.J. 2001. *Agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. Infect. Immun. 69: 7074-7082.
- * RABELLO, R. F., SOUZA, C. R. V. M., DUARTE, R. S., LOPEZ, R. M. M., TEIXEIRA, L. M. y CASTRO, A. C. D. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates Recovered from Bovine Mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J. Dairy Sci. 88:3211–321.

- * RAINARD, P., and POUTREL, B. 1991. Immunization against mastitis: a practical goal? *Hem. Vet. J.* 62:141-149.
- * RAINARD, P. and POUTREL, B. 1995. Deposition of complement components on *Streptococcus agalactiae* in bovine milk in the absence of inflammation. *Infect. Immun.* 63:3422-3427.
- * RAINARD, P. and RIOLLET, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37: 369–400.
- * RATHER, P. N., DAVIS, A.P. and WILKINSON, B.J. 1986. Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase-negative staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* 23:858.
- * REITER, B. and ORAM, J.D. 1967. Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids. *Nature.* 216:328-330.
- * RIMBAUD, E. and LORENZO, P. 2004. Revista electrónica de Veterinaria REDVET r ISSN 1695-7504. Vol V N° 10.
- * RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. 2000. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:161-167.

* RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. J. Dairy Sci. 84:1077- 1084.

* ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D. and BESSER, T.E.1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive Staphylococci. J. Clin. Microbiol. 30: 3217-3219.

* ROBERSON, J. R., FOX, L. K., HANCOCK, D. D., GAY, J. M., and BESSER, T. E. 1998. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. J.Dairy Sci. 81:687–693.

* SAÏD-SALIM, B., MATHEMA, B., BRAUGHTON, K., DAVIS, S., SINSIMER, D., EISNER, W. 2005. Differential distribution and expression of Pantone-Valentine leucocidin among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 43:3373-3379.

* SANDGREN, C.H., MAMO, W., LARSSON, L., LINDAHL, M., and BJÖRK, L. 1991. A periodate-sensitive anti-phagocytic surface structure, induced by growth in milk whey on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Microbial Pathogenesis. 11:211-220.

- * SCHAFFER, A.C. and LEE, J.C. 2009. Staphylococcal Vaccines and Immunotherapies. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23:153-171.

- * SCHALM, O.W.; LASMANIS, J.; JAIN, N.C. 1976. Conversion of chronic staphylococcal mastitis to acute gangrenous mastitis after neutropenia in blood and bone marrow produced by an equine anti-bovine leukocyte. *Am. J. Vet. Res.* 37:885-890.

- * SCHANBACHER, F.L.; GOODMAN, R.E.; TALHOUK, R.S. 1993. Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy Sci.* 76:3812-3831.

- * SCHMITT, C.K., MEYSICK, K.C., O'BRIEN, A.D. 1999. Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg. Infect. Dis.* 5:224-34.

- * SCHULTZE, W. D., and PAAPE, M.J. 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.

- * SEARS, P. 2002. Staphylococcal Vaccines: What are the New Strategies. National Mastitis Council Annual Meeting, Orlando. Fl. 73-79.

- * SELSTED, M.E.; TANG, Y.Q.; MORRIS, W.L.; MC QUIRE, P.A.; NONOTNY, M.J.; SMITH, W.; HENSCHEN, A.H.; CULLOR, J.S. 1993. Purification, primary

structures, and antibacterial activities of the beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268:6641-6644.

* SEZA ARSLAN, FATMA ÖZKARDES. 2007. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 102 :29-33.

* SHAFER-WEAVER, K.; SORDILLO, L.M. 1996. Enhancing bactericidal activity of bovine lymphoid cells during the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 79:1347-1352.

* SHAFER-WEAVER, K.A.; and SORDILLO, L.M. 1997. Bovine CD8C suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56: 53-64.

* SHAFER-WEAVER, K.A, CORL, C.M.; SORDILLO, L.M. 1999. Shifts in bovine CD4C subpopulations increase TH-2 compared to TH-1 effector cells during the postpartum period. *J. Dairy Sci.* 82:1696-1706.

* SHAFER-WEAVER, K.A.; PIGHETTI, G.M.; SORDILLO, L.M. 1996. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212:271-280.

- * SHAFER-WEAVER, K.A, CORL, C.M.; SORDILLO, L.M. 1999. Shifts in bovine CD4C subpopulations increase TH-2 compared to TH-1 effector cells during the postpartum period. *J. Dairy Sci.* 82:1696-1706.
- * SHAW, L., GOLONKA, E.; POTEMPA, J. and FOSTER, S.J. 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 150: 217-228.
- * SHINEFIELD, H., BLACK, S., FATTOM, A., HORWITH, G., RASGON, S., ORDONEZ, J., YEOH, H., LAW, D., ROBBINS, J.B., SCHNEERSON, R., MUENZ, L., FULLER, S., JOHNSON, J., FIREMAN, B., ALCORN, H. and NASO, R. 2002. Use of *Staphylococcus aureus* conjugates vaccine in patients receiving hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 346: 491-496.
- * SHKRETA, L.; TALBOT, B.G.; DIARRA, M.S. and 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. and BAYLES, K.W. 2003. Biphasic intracellular expression of *Staphylococcus aureus* virulence factors and evidence for Agr-mediated diffusion sensing. *Mol. Microbiol.* 49: 919-927.

- * SHUSTER, D.E.; KHERLI, M.E.1995. Administration of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist during endotoxin-induced mastitis in cows. Am. J. Vet. Res. 56:313-320.
- * SHUSTER, D.E.; LEE, E.K.; KEHRLI, M.E. 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. Am. J. Vet. Res. 57:1569-1575.
- * SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E .Jr; RAINARD, P.; PAAPE, M. 1997. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. Infect. Immun. 65:3286-3292.
- * SINHA, B., FRANCOIS, P.P.; NUSSE, O.; FOTI, M.; HARTFORD, O.M.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T.J.; LEW, D.P.; HERRMANN, M. and KRAUSE, K.H. 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. Cell. Microbiol. 1: 101-117.
- * SMITH, P.K, KROHN, R.I.; HERMANSON, G.Y.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO,M.D.; FUJIMOTO,E.K.; GOEKE,N.M.; OLSON, B.J. and KLENK, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85.

* SOMPOLINSKY, D., SAMRA, Z., KARAKAWA, W.W., VANN, W.F., SCHNEERSON, R. and MALIK, Z. 1985. Encapsulation and capsular types in isolated of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. J. Clin. Microbiol. 22: 828-834.

* SORDELLI, D.O., BUZZOLA, F.R., GÓMEZ, M.I. STEELE-MOORE, L., BERG, D., GENTILINI, E., CATALANO, M, REITZ, A.J., TOLLERSRUD, T., DENAMIEL, G., JERIC, P., and LEE, J.C. 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. J. Clin. Microbiol. 38: 846-850.

* SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C.; AKERS, R.M.; OLIVER, S.P. 1987. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. Int. J. Biochem. 19:1165-1170.

* SORDILLO, L.M. and NICKERSON, S.C. 1988. Morphometric changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. Am. J. Vet. Res. 49:1112-1120.

* SORDILLO, L., NICKERSON, S., AKERS, R.M. 1989. Pathology of *S. aureus* mastitis during Lactogenesis: relationship with bovine mammary structure and function. J. Dairy Sci. 7:228-236.

- * SORDILLO, L.M. and BABIUK, L.A. 1991. Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following *in vitro* exposure to recombinant bovine interferon gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27:393-402.

- * SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K. and DE ROSA, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80: (8): 1851-1865.
- * SORDILLO, L.M.; STREICHER, K.L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol. Neop.* 7:135-146.

- * SORENSEN, J.T.; ENEVOLDSEN, C. 1991. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1277-1283.

- * STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A. and LAMMERS, C.H. 2001. Characterization of enterotoxigenic *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis in Northeast Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78: 373-382.

- * STRINGFELLOW, W.T.; DASSY, B.; LIEB, M. and FOURNIER, J.M. 1991. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 618-621.

- * SUTHERLAND, I., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 147:3-9.

* SUTRA, L. and POUTREL, B. 1990. Detection of capsular polysaccharide in milk of cow with natural intramammary infection caused by *S.aureus*. Am. J. Vet. Res. 51:1857-1859.

* SUTRA, L.; RAINARD, P. and 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. J. Clin. Microbiol. 28:2253-2258.

* SUTRA, L. and POUTREL, B. 1994. Factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 40:79-89.

* TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. 2003. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. 21:335-376.

* TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K. and AKIRA, S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. J. Immunol. 165:5392-5396.

* TAURO, P. and KAPPOR, K. S. 1986. An Introduction to Microbiology, New Age Publishers, ISBN: 0852268785.

* TAYLOR, B.C.; DELLINGER, J.D.; CULLOR, J.S.; SCOTT, J.L. 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8⁺. Cell. Immunol. 156:245-253.

* TAYLOR, B.C.; KEEFE, R.G.; DELLINGER, J.D.; NAKAMURA, Y.; CULLOR, J.S.; STOTT, J.L. 1997. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell Immunol.* 182:68-76.

* TEIXEIRA, M.M.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T. 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 4: 883-886.

* THAKKER, M.; PARK, J.S.; CAREY, V. and 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.

* TIZARD, I.R. 2002. *Inmunología Veterinaria*. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. 6ta edición.

* TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ, A.J., and LEE, J. C. 2000. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolated of *Staphylococcus aureus* and others *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2998-3003.

* TOLLERSRUD, T.; ZERNICHOW, L.; ANDERSEN, S.R.; KENNY, K. and LUND, A. 2001. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 conjugate

and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. *Vaccine* 19:3896-3903.

* TREECE, J.M; MORESE G.E. and LLEVY, C. 1966. Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.* 49:1240-1244.

* ÚBEDA, C.; TORMO, M.A.; CUCARELLA, C.; TROTONDA, P.; PALACIO, J.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. 2002. La variación de fase en la expresión de Bap regula la formación de biofilm y el proceso infectivo de *Staphylococcus aureus*. XXVII jornadas científicas y VI jornadas internacionales de la Sociedad española de ovinotecnia y caprinotecnia. ISBN: 84-95219-57-3

* ÚBEDA, C.; TORMO, M.A.; CUCARELLA, C.; TROTONDA, P.; FOSTER, T.J.; LASA, I., 2003. Sip an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol.* 49:193-210.

* VADILLO, S.; PÍRIZ, S.; MATEOS, E. 2002. Género *Staphylococcus*. Manual de Microbiología Veterinaria. Cap 30.p. 431-436. McGraw-Hill-Interamericana.

* VANN, W.F.; MOREAU, M.; SUTTON, R.; BYRD, A. and KARAKAWA, W.W. 1988. Structure and immunochemistry of *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide, p. 187-198. In M.A.Horwitz (ed). *Bacterial-host cell interaction*, vol.

64. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. Alan R. Liss, Inc, New York, N.Y.

* VAN KAMPEND, C.; MALLARD, B.A. 1997. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59:79-91.

*VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T. and VENKITANARAYANAN, K.S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* 92: 179-185.

* VERBRUGH, H.A.; PETERSON, P.K., NGUYEN, B.Y.; SISSON, S.P. and KIM, Y. 1981. Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus* in patients with serious staphylococcal infection. *J. Infect. Dis.* 144:1-9.

* VERBRUGH, H.A.; PETERSON, P.K., NGUYEN, B.Y.; SISSON, S.P. and KIM, Y. 1982. Opsonization of encapsulated *Staphylococcus aureus*: the role of specific antibody and complement. *J. Immunol.* 129:1681-1687.

* VERDIER, I.; DURAND, G.; BES, M.; TAYLOR, K.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; FATTOM, A. and ETIENNE, J. 2007. Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests. *J. Clin. Microbiol.* 45: 725–729.

- * WAGSTROM, E.A.; YOON, K.J.; ZIMMERMAN, J.L. 2000. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol.* 13:383-397.

- * WANG, Y.; ZARLENGA, D.S.; PAAPE, M.J.; DAHL, G.E. 2002. Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86:115-124.

- * WATSON, D.L. and LASCELLES, A.K. 1975. The influence of systemic immunization during mammary involution on subsequent antibody production in the mammary gland. *Res. Vet. Sci.* 18:182-185.

- * WATSON, D. L., and PRIDEAUX, J.A. 1979. Comparisons of *Staphylococcus aureus* grown in vitro or in vivo. *Microbiol. Immunol.* 2393.

- * WATSON, D. L. 1982. Virulence of *Staphylococcus aureus* grown *in vitro* or *in vivo*. *Res. Vet. Sci.* 32: 311-315.

- * WATSON, D. L. and WATSON, N.A. 1989. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Res. Vet. Sci.* 47:152-157.

- * WATSON, D.L., and SCHWARTZKOFF, C.L. 1990. A field trial to test the efficacy of a staphylococcal mastitis vaccine in commercial dairies in Australia. Pg. 73-78. In: Proc. Internatl. Symp. Bovine Mastitis. Indianapolis, IN.

- * WATSON, D. L. 1992. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers. Res. Vet. Sci. 53:346-353.

- * WATSON, D.L.; KERLIN, R.L.; EAST, I.J., and COLDITZ, I.G. 1993. Vaccines for the skin and mammary gland of ruminants. In: Progress in Vaccinology. Vol. 4, Veterinary Vaccines. R. Pandey, S. Höglund, and G. Prasad (eds.). Springer-Verlag, New York. Pg. 288-317.

- * WATTS, J.L. 1988. Etiologic agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16:41-66

- * WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H. M. and VAN OIRSCHOT, J. T. 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Vet. Microbiol. Article 2361, pp. 2-21.

- * WERLING, D.; J. PIERCY and COFFEY, T.J. 2006. Expression of toll-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? Vet. Immunol. Immunopathol. 112:2-11.

* WESSON, C. A.; LIOU, L.E.; TODD, K.M.; BOHACH, G.A.; TRUMBLE, W.R. and BAYLES, K.W. 1998. *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66: 5238-5243.

* WESSON, C. A.; DERINGER, J.; LIOU, L.E.; BAYLES, K.W.; BOHACH, G.A. and TRUMBLE, W.R. 2000. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. *Infect. Immun.* 68: 2998-3001.

* WILEY, B. and MAVERAKIS, N. 1974. Capsule production and virulence among strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann N.Y. Acad.Sci.* 236:221-232.

* WILKINSON, B.J. 1983. Staphylococcal capsules and slime, p.481-523. In. C. Easmon and C. Adlam (ed), *Staphylococci and staphylococcal infections*, vol. 2 Academic Press, London, England.

* WILSON, D.J.; GONZALES, R.N. and DAS, H.H. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. Dairy Sci.* 80:2592-2598.

* XU, S.; ARBEIT, R.D. and LEE, J.C. 1992. Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 60:1358-1362.

- * YANCEY, R.J. 1993. Recent advances in bovine vaccine technology. J. Dairy Sci. 76:2418-2436.
- * YANCEY, R.J. 1999. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: facts and fiction. Adv. Vet. Med. 41:257-273.
- * YAO, L.; BENGUALID, V.; LOWY, F.D.; GIBBON, J.J.; HATCHER, V.B. and BERMAN, J.W. 1995. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces cytokine gene expression. Infect Immun. 63:1835-1839.
- * YOKOMIZO, Y.; MORI, Y.; SHIMOJI, Y.; SHIMIZU, S.; SENTSUI, H.; KODAMA, M.; IGARASHI, H.1995. Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-I. J. Vet. Med. Sci. 57:299-305.
- * ZECCONI, A.; BRONZO, V.; PICCININI, R.; SPREAFICO, G.; RUFO, G. 1994. Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes. J. Dairy Res. 61:271-279.
- * ZECCONI, A.; CALVINHO, L.F. and FOX, L. 2006. *Staphylococcus aureus* intramammary infections. Bulletin of the International Dairy Federation. 408. Pp. 30
FIL-IDF ISSN 0250-5118.

* ZHAO, X. and LACASSE, P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Cause and control. J. Anim.Sci. 1: 57-65.