

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

Diseño, construcción y evaluación de un inmunógeno específico para la prevención de mastitis bovina producida por *Streptococcus uberis*.

Autora: Lic. Melina Perrig.

Directora de Tesis: Dra. Carolina Veaute.

Co-directora de Tesis: Dra. María Sol Barbagelata.

Lugar de realización: Laboratorio de Tecnología Inmunológica - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral

A mis padres...

ABREVIATURAS.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	10
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	15
Capítulo I: Introducción a la mastitis bovina	17
I.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	18
I.1.1 Mastitis bovina.....	18
I.1.2 Susceptibilidad a infecciones intramamarias	19
I.1.3 Desarrollo de la enfermedad	22
I.1.4 Clasificación de tipos de mastitis.....	25
I.1.5 Mastitis en vaquillonas	25
I.1.6 Patógenos bacterianos causantes de mastitis bovina	27
I.1.7 Alteraciones en mastitis por <i>S. uberis</i>	28
I.1.8 Medidas de Control para mastitis bovina.....	28
I.1.9 Pérdidas económicas	29
I.1.10 Inmunidad de la glándula mamaria.....	30
I.1.11 Hipótesis de trabajo.....	43
Capítulo II: Estudio genético-epidemiológico de <i>S. uberis</i>	45
II.2 OBJETIVO GENERAL.....	49
II.2.1 Objetivos específicos:.....	50
II.3 MATERIALES Y MÉTODOS	51
II.3.1 Aislamientos bacterianos incluidos en este estudio.....	51
II.3.2 Extracción de adn genómico de <i>Streptococcus uberis</i>	51
II.3.3 Cebadores utilizados.....	52
II.3.4 Visualización de los productos de PCR en geles de agarosa.....	53
II.3.5 Identificación molecular de especie	53
II.3.6 Análisis epidemiológico de cepas de <i>S. uberis</i>	55
II.3.7 Amplificación de genes codificantes para dos factores de virulencia de <i>S. uberis</i> : pauA y sua	58
II.4 RESULTADOS	61

II.4.1 Aislamientos de <i>Streptococcus uberis</i>	61
II.4.2 Tipificación molecular de aislamientos.....	63
II.4.3 Estudio genético de factores de virulencia	66
II.4 DISCUSIÓN	69
II.5 CONCLUSIONES PARCIALES.....	74
Capítulo III: Estudio preliminar de antígenos y funcionalidad de anticuerpos en modelo murino	75
III.1 MARCO TEÓRICO	76
III.2 OBJETIVO GENERAL.....	82
III.2.1 Objetivos específicos.....	83
III.3 MATERIALES Y MÉTODOS	84
III.3.1 Obtención de los antígenos recombinantes	84
III.3.2 Extracción de proteínas wild type.....	93
III.3.3 Evaluación de inmunogenicidad de las proteínas recombinantes	94
III.3.4 Evaluación de especificidad de anticuerpos.....	96
III.3.5 Ensayos de funcionalidad de anticuerpos Policlonales específicos anti-SUAM97	
III.3.6 Ensayo de unión a lactoferrina	101
III.3.7 Evaluación de actividad de PauAr y funcionalidad de los anticuerpos	101
III.3.7.1.2 Purificación de plasminógeno	102
III.3.8 Análisis estadísticos	103
III.4 RESULTADOS	104
III.4.1 Predicción de epítopes para la proteína SUAM	104
III.4.2 Clonado de factores de virulencia	105
III.4.3. Extracción de las proteínas wild type de cepas caracterizadas de <i>S. uberis</i>	113
III.4.4 Evaluación de la respuesta inmune humoral en ratones.....	114
III.4.5 Determinación de especificidad de anticuerpos anti-SUAM y anti PauAr.....	117
III.4.6 Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos anti-SUAM	123
III.4.6.2 Opsonización y Fagocitosis.....	124
III.4.7 Evaluación del rol de cada una de las fracciones de SUAM en la unión a lactoferrina	126
III.4.8 Evaluación de funcionalidad de anticuerpos anti-PauAr	128

III.5 DISCUSIÓN	131
III.6 CONCLUSIONES PARCIALES	141
Capítulo IV: Evaluación de un prototipo vacunal en bovinos.	142
IV.1 MARCO TEÓRICO	143
IV.2 OBJETIVO GENERAL	149
IV.2.1 Objetivos particulares	150
IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	151
IV.3.1 Ensayo de inmunización en bovinos.....	151
IV.3.2 Evaluación de la respuesta humoral.....	153
IV.3.3 Análisis estadístico.....	154
IV.4. RESULTADOS	155
IV.4.1 Ensayo de inmunización – Animales.....	155
IV.4.2 Respuesta de anticuerpos en sangre	155
IV.4.3 Respuesta de anticuerpos en leche	161
IV.5 DISCUSIÓN.....	163
IV.6 CONCLUSIONES PARCIALES	167
CONCLUSIONES GENERALES.....	168
ANEXO 1: Soluciones y medios de cultivos.....	169
1. Soluciones y Medio de cultivo Capítulo II.....	169
2. Soluciones y Medios de cultivo Capítulo III.....	170
ANEXO 2: Material complementario.....	173
1. Material complementario Capítulo II	173
2. Material complementario Capítulo III	184
BIBLIOGRAFIA	192

ABREVIATURAS

- **ABE:** Agar Bilis Esculina
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AL:** Hidróxido de Aluminio
- **ALS:** Hidróxido de Aluminio más Saponina
- **ARNm:** Acido desoxirribonucleico mensajero
- **ARNr:** Acido desoxirribonucleico ribosomal
- **ASB:** Albúmina sérica bovina
- **BHI:** Infusion Cerebro Corazón
- **BrEt:** Bromuro de Etidio
- **C1q:** componente C1q del complemento
- **C3a:** componente C3a del complemento
- **C3b:** componente C3b del complemento
- **C3bi:** componente C3b inactivado del complemento
- **C3i:** componente C3 inactivado del complemento
- **C4b:** componente C4b del complemento
- **C5a:** fagmento proteico liberado a partir del clivaje del componente C5 del complemento
- **CAMP:** Christie, Atkins, Munch y Petersen
- **CEM:** Células Epiteliales Mamarias
- **CPA:** Célualas Presentadoras de Antígeno
- **CR1:** Receptor del componente C1 del complemneto
- **CR3:** Receptor del componente C3 del complemneto
- **CTL:** Linfocitos T citotóxicos
- **D.O:** Densidad Óptica
- **D:** Índice de Simpson
- **DAB:** Diaminobencidina
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DE:** Desviación Estandar
- **dNTP:** Desoxinucleótidos trifosfato
- **ϵ -ACA:** epsilon Acido Amino Caproico
- **ECN:** Estafilococos Coagulasa Negativos
- **EEM:** Error Estándar de la Media
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético
- **ELISA:** Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
- **FAO:** Food and Agriculture Organization of United Nations

- **FcRn:** Receptor de IgG
 - **FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína
 - **FPP:** Fecha probable de parto
 - **GM:** glándula mamaria
 - **IC:** Intervalo de Confianza
 - **Ig:** inmunoglobulina
 - **IGF-1:** factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1 del inglés Insulin-like Growth Factor)
 - **IIM:** Inflamación Intra Mamaria
 - **IL:** interleuquina
 - **IMF:** intensidad media de fluorescencia
 - **IFN:** interferón
 - **IPTG:** isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
 - **ISCOM:** del inglés inmunoestimulating complex
 - **ISPA:** partícula inmunoestimulante (del inglés Immunoestimulant particule)
 - **kpb:** Kilo pares de bases
 - **kDa:** Kilo Dalton
 - **LAP:** Péptido antimicrobiano lingual
 - **LB:** linfocitos B
 - **LBP:** proteína de unión a lactoferrina, (del inglés LFb-binding protein)
 - **LF:** Lactoferrina
 - **LFb:** Lactoferrina bovina
 - **LPS:** lipopolisacáridos
 - **LT:** linfocitos T
 - **M:** molar
 - **MC:** Mastitis clínica
 - **MCC:** Medio de Crecimiento Celular
 - **Medio LB:** Medio de cultivo Luria Bertani
 - **Mf:** Macrófagos
 - **MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad
 - **MLST:** Tipificación Multilocus de Secuencia
 - **mM:** mili molar
 - **MOI:** Multiplicidad de Infección
 - **MPL:** Monofosfolipido A
 - **MPO:** Mieloperoxidasa
 - **MSC:** Mastitis subclínica
 - **N:** normal
 - **NAGase:** N-acetil- β -D-glucosaminidasa
-

- **NCBI:** Centro Nacional de Información en Biotecnología.
- **NK:** Células Asesinas Naturales (del inglés Natural Killer)
- **NMC:** del inglés Nacional Mastitis Council
- **NT:** No Tipificable
- **PAGE- SDS:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
- **PAMP:** Patrón Molecular Asociado a Patógenos
- **PauA:** Activador del Plasminógeno de *S. uberis*
- **pb:** pares de bases
- **PBS:** Solución amortiguadora fosfato salino
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PF:** Tipo obtenido por PFGE
- **PFGE:** Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
- **pIgR:** receptor polimérico de Ig
- **Plg:** plasminógeno
- **PM:** Peso Molecular
- **PMAD:** Patrón Molecular Asociado a Daños
- **PMN:** Neutrófilo Polimorfonuclear
- **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés PhenylMethylSulfonyl Fluoride)
- **r.p.m:** revoluciones por minuto
- **RAPD-PCR:** del inglés Random Amplification of Polymorphic DNA - PCR
- **RD:** Tipo obtenido por RAPD-PCR.
- **RFLP:** Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción.
- **ROS:** especies reactivas del oxígeno
- **RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute
- **RRP:** Receptores de Reconocimiento de Patrones
- **SC:** Sistema del Complemento
- **SCC:** Número de células somáticas (del inglés Somatic Cell Count)
- **SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio
- **ST:** Tipo de Secuencia
- **ST1:** Solución de Transformación uno
- **ST2:** Solución de Transformacion dos
- **StaA:** Sortasa A
- **SU:** Streptococcus uberis
- **SUAM:** Molécula de Adhesión de *S. uberis*
- **SUAM-1 fr:** fracción 1 recombinante de la Molécula de adhesión de *S. uberis*
- **SUAM-2 fr:** fracción 2 recombinante de la Molécula de adhesión de *S. uberis*
- **SUAM-3 fr:** fracción 3 recombinante de la Molécula de adhesión de *S. uberis*
- **SUAM-4 fr:** fracción 4 recombinante de la Molécula de adhesión de *S. uberis*

- **SUAM-5 fr:** fracción 5 recombinante de la Molécula de adhesión de *S. uberis*
- **TAE:** Solución Tampón Tris-Acético-EDTA
- **TCR:** Receptor de Células T
- **TE:** Solución Tampón Tris-EDTA
- **LTh:** Linfocitos T colaboradores
- **TLR:** Receptores de Tipo toll
- **TMB:** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
- **TMR:** Ración totalmente mezclada
- **TNF:** Factor de Necrosis Tumoral
- **LTregs:** Linfocitos T reguladores
- **TRX:** Tioredoxinas
- **U:** Unidades Internacionales
- **UFC:** Unidad Formadora de Colonias
- **UV:** Ultra Violeta
- **V:** Voltios
- **W:** Coeficiente de Wallace
- **wt:** wild type
- **xg:** Fuerza centrífuga, medida como gravedad
- **β-ME:** β- Mercapto Etanol
- **μM:** micromolar

AGRADECIMIENTOS...

Quiero agradecer a todas las personas que de algún modo hicieron posible este trabajo. En primer lugar agradecer a mis directoras la Dra. Carolina Veaute y la Dra. María Sol Barbagelata, ambas me dieron la oportunidad de crecer profesionalmente. Les agradezco por que nunca me dejaron bajar los brazos y me alentaron a descubrir una alternativa para sortear aquellos inconvenientes a los que nos enfrenta la ciencia. Les agradezco su predisposición en todo estos años tanto a nivel profesional como personal. Agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL por admitirme en sus instalaciones para la realización de la carrera de doctorado en Ciencias Biológicas. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científico Técnicas que me otorgaron las becas de posgrado. Al Dr. Iván Marcipar que junto a la Dra. Veaute me dieron la oportunidad de ingresar al laboratorio de Tecnología Inmunológica en el año 2008. Gracias Iván por permitirme llevar a cabo esta tesis en tu laboratorio. Al Dr. Eduardo Esteban por seleccionarme como becaria en un proyecto a futuro, para el crecimiento de profesionales en el marco de centro de biotecnología de la Alpina. Al Dr. Luis Calvino, que se mantuvo siempre comprometido con mi trabajo y dispuesto a responder mis inquietudes. Le agradezco por la posibilidad que me brindó para realizar los ensayos en bovinos, poniendo a mi disposición los animales e instalaciones del INTA de Rafaela. El es responsable de la formación del grupo interdisciplinario de investigación en mastitis INTA-UNL-CONICET. El trabajo cooperativo de cada uno de los integrantes, en especial a la Dra. Cecilia Camussone que se comprometió con este trabajo en los ensayos realizados en INTA. Por otro lado quiero agradecer a la Dra. Fernanda Buzola por permitirme llevar a cabo ensayos en su laboratorio y colaborar en el proyecto. Al Dr. Hugo Ortega y la Dra. María Sol Renna, por permitirme llevar a cabo los ensayos en cultivos de células en su laboratorio, y muy especial a Sol por tu paciencia en cada consulta! A la Liliana Tirante del Laboratorio Lactodiagnostico Sur por brindarme los aislamientos y a todo su grupo de trabajo por su predisposición en cada solicitud. Agradecer también al Laboratorio de Cultivos Celulares-Zeltek, por permitirme realizar los ensayos de citometría, en especial a la Dra. Milagros Burgi, por su predisposición y tiempo. Gracias a la Dra. Cristina Diez, Dra. Ma. Inés García y Dra.

Adriana Sotullo por su buena predisposición a atender mis consultas y permitirme en el ingreso a su laboratorio para realizar ensayos.

A mis compañeros de laboratorio, que formaron parte del grupo de trabajo durante estos años: Gaby, Nare, Xio, Ivancita, Pola, Anto, Nati, Twe, Ger, Iva, Bruno, Migue, Bel, Flor y Dai. Gracias por la paciencia, por escucharme, por alentarme a seguir, por hacerme reír en esos momentos complicados, por hacer que ir al laboratorio sea un momento de reunión entre amigos donde uno genera resultados. En especial a mi compañera y amiga Belencita quien colaboró desinteresadamente en mis ensayos.

A mis papas, quienes nunca escondieron una sonrisa. Su humildad, espíritu de lucha y perseverancia, me dejan grabado enseñanzas que no se aprenden de ningún libro. A mis hermanas, Vani y Marian, por formar parte de mí, desde los toboganes hasta los mates que compartimos estos años, a mis sobrinos que con su inocencia hacen felices mis días con cada abrazo, cada sonrisa o un simple llamado de teléfono.

Estoy agradecida a mis amigas, mis hermanas de la vida, Luli, Cache, Lore, Meli, Jessi y Carola, por estar siempre cerca de alguna manera y darme su apoyo incondicional. Sentir su cariño fue muy importante a lo largo de estos años... me dieron refugio en las adversidades y compañía para celebrar mis éxitos.

RESUMEN

La mastitis bovina es una importante enfermedad que sufre el ganado lechero. Es la responsable de grandes pérdidas económicas en los productores y la industria láctea, una de las principales actividades económicas de Argentina. El *Streptococcus uberis* es un patógeno ambiental que no logra ser controlado con las medidas establecidas por los organismos internacionales y nacionales. La alta incidencia de este patógeno tanto en Argentina como en otros países del mundo y la falta de eficacia en las terapias antibióticas en períodos de mayor incidencia, enfoca el problema en la búsqueda de una terapia alternativa, tendiendo al menor uso de antibióticos como son las terapias inmunoproliféricas. En la actualidad no existe una vacuna en el mercado. Los resultados experimentales obtenidos hasta el momento con vacunas vivas, muertas y extracto de proteínas o proteínas recombinantes, muestran un control parcial de la infección. Debido a que *S. uberis* es un patógeno ambiental, el tratamiento y la prevención de infecciones provocadas por este microorganismo deben dirigirse a una multitud de cepas diferentes. Estas observaciones señalan la necesidad de explorar los aislamientos regionales para la elección de candidatos vacunales adecuados. Los resultados brindarán información de importancia para mejorar las alternativas de prevención planteadas y focalizar el problema local.

El objetivo central de este trabajo fue desarrollar un inmunógeno específico para la prevención de mastitis bovina producida por *S. uberis*. Para alcanzar ese objetivo, el trabajo se dividió en tres etapas. En una primera instancia se analizó la variabilidad clonal de *S. uberis* de aislamientos representativos de las principales cuencas lecheras del país, así como la prevalencia y conservación de los genes de virulencia (*pauA* y *sua*). La selección de estos dos factores de virulencia se basó en el rol que poseen en la etapa inicial de la infección intramamaria por *S. uberis*. Dos técnicas de tipificación molecular (PFGE y RAPD-PCR) fueron utilizadas para establecer la relación genética entre los aislamientos. El análisis determinó una gran variabilidad clonal entre los aislamientos y no logró asociar ningún patrón clonal a un tipo de mastitis. A pesar de la alta variabilidad clonal, los genes estudiados se detectaron en la mayoría de los aislamientos. Más aún, presentaron

secuencias con alta identidad a nivel nucleotídico, tanto entre cepas regionales como con cepas internacionales. Por lo tanto, estos resultados indicaron que tanto PauA como SUAM serían buenos candidatos para formar parte de una vacuna a subunidades.

En la segunda etapa de este trabajo, se propuso realizar una evaluación funcional e inmunológica, en un modelo murino, de los antígenos seleccionados. Para eso, se obtuvieron en forma recombinante, 4 fracciones de SUAM (SUAM-1fr, SUAM-2fr, SUAM-3fr, SUAM-4fr) y PauA (PauAr). Se demostró que todos los antígenos eran inmunogénicos en ratones. Con respecto a PauAr, se mostró que era funcionalmente activa, y los anticuerpos generados eran específicos. En cuanto a las fracciones de SUAM, se evaluó su capacidad de unión a lactoferrina (LF), y respecto a los anticuerpos generados, se analizó su capacidad de mediar la fagocitosis, su especificidad y su capacidad de inhibir la adherencia a células epiteliales mamarias. Los anticuerpos anti-SUAM-1fr mostraron mayor especificidad contra la proteína wild type, mayor interferencia en la adherencia de *S. uberis* a células epiteliales mamarias y mayor capacidad opsónica respecto a las otras fracciones. Asimismo, se observó que SUAM-1fr y SUAM-4fr mostraron una tendencia a unirse en mayor proporción a la LF. En base a los resultados obtenidos en estos ensayos se determinó a la región SUAM-1fr como potencial componente de una vacuna a subunidad.

Finalmente, se evaluó la respuesta humoral en vaquillonas preñadas utilizando 2 dosis a los 45 y 15 días previos a la fecha probable de parto, de una formulación conteniendo SUAM-1fr y PauAr, con tres adyuvantes diferentes. La respuesta en sangre mostró niveles de anticuerpos superiores a los controles en todos los grupos inmunizados. La inmunización elevó los niveles de IgG₂ específicos. Además, se observó que los adyuvantes conteniendo saponina generaron una respuesta humoral superior a los obtenidos con el adyuvante clásico hidróxido de aluminio más comúnmente utilizado en vacunas veterinarias. En leche, también se obtuvieron anticuerpos específicos hacia los dos inmunógenos, y la respuesta no mostró diferencias significativas entre los tres adyuvantes. Estos resultados demostraron que la incorporación de más de un antígeno a la formulación, no altera la inmunogenicidad individual de cada molécula. Además, indicarían que la saponina estaría potenciando la respuesta inmune. Por otro lado, el hecho de que la inmunización haya inducido la

producción de IgG₂ específicas en sangre resulta alentador y permitiría sugerir que, frente a una inflamación, esta subclase estaría presente en leche.

Este trabajo permitió determinar que los dos candidatos vacunales altamente conservados y prevalentes entre una amplia diversidad clonal de cepas de Argentina, son capaces de generar una respuesta inmune significativa. Más aún los resultados indicarían una región dentro de la molécula SUAM, que cumpliría un rol importante dentro del mecanismo patogénico propuesto. Además, las inmunizaciones en bovinos, con el prototipo vacunal indicarían que ambas proteínas, formuladas con el adyuvante adecuado, son capaces de inducir una respuesta inmune que resulta alentadora para ensayos futuros de vacunas hacia IIM por *S. uberis*.

ABSTRACT

Bovine mastitis is an important disease of dairy cattle. It is responsible for great economic losses for farmers and the dairy industry, one of the main economic activities in Argentina. *Streptococcus uberis* is an environmental pathogen that fails to be controlled with the measures laid down by international and national bodies. The high incidence of this pathogen both in Argentina and other countries of the world and the lack of effective antibiotic therapy during periods of increased incidence, focus the problem in the search for an alternative therapy tending to lower use of antibiotics, such as Immunoprophylactic therapies. Currently, there is still no vaccine on the market. The experimental results obtained to date with live, dead and extracted or recombinant protein vaccines show partial control of infection. Due to *S. uberis* is an environmental pathogen, treatment and prevention of infections caused by this microorganism should be addressed to a multitude of different strains. These observations indicate the need to explore regional isolates for the choice of appropriate vaccine candidates. The results will provide important information to improve prevention alternatives raised and targeted to the local problem.

The main objective of this work was to develop a specific immunogen for the prevention of bovine mastitis caused by *S. uberis*. To achieve this objective, the work was divided into three stages. In the first instance the clonal variability of *S. uberis* isolates representative of the major milk producing areas of the country, as well as the prevalence and conservation of virulence genes (*pauA* and *sua*) were analyzed. The selection of these two virulence factors was based on the role they have in the initial stage of intramammary infection with *S. uberis*. Two techniques of molecular subtyping (PFGE and RAPD-PCR) were used to establish the genetic relationship between isolates. The analysis found a clonal variability between isolates and failed to associate any clonal pattern to a type of mastitis. Despite the high clonal variability, the studied genes were detected in most isolates and furthermore, showed high sequence identity at the nucleotide level between both regional and international strains. Therefore, these results indicated that both SUAM and PauA would be good candidates for a subunit vaccine.

The second stage of this work was a functional and immunological evaluation of the selected antigens in a murine model. Then, the following recombinant proteins were obtained: four fractions of SUAM (SUAM-1fr, SUAM-2fr, SUAM-3fr and SUAM-4fr) and PauA (PauAr). All these antigens were immunogenic in mice. PauAr showed to be functionally active and induced specific antibodies. SUAM fractions were assessed for their ability to bind to lactoferrin (LF), and anti-SUAM antibodies were studied for their ability to mediate phagocytosis, their specificity and their ability to inhibit adherence to mammary epithelial cells. Anti-SUAM-1fr antibodies showed more specificity against wild type protein, more interference in adhesion of *S. uberis* to mammary epithelial cells and greater opsonic activity, compared to the other fractions. Also, it was observed that SUAM-1fr and SUAM-4fr tended to bind in greater proportion to LF. Based on the results obtained in these tests SUAM-1fr was chosen as a potential region for a subunit vaccine.

Finally, the humoral response in pregnant heifers inoculated with 2 doses, at 45 and 15 days before the expected calving date, of a formulation containing SUAM-1fr and PauAr, with three different adjuvants, was evaluated. The response in blood showed higher levels of antibodies in all immunized groups compared to controls. Immunization elevated the levels of specific IgG₂. Furthermore, saponin containing adjuvants induced a stronger humoral response than those obtained with the classic aluminum hydroxide adjuvant, most commonly used in veterinary vaccines. In milk, specific antibodies against both immunogens were also obtained. These results demonstrated that the incorporation of more than one antigen to the formulation does not alter the immunogenicity of each particular molecule, and suggest that saponin enhances the immune response. Furthermore, the fact that immunization has induced the production of specific IgG₂ in blood is encouraging and suggests that this subclass would be present in milk, in an infection scenario.

This study allowed us to determine that the two highly conserved and prevalent vaccine candidates are able to generate a significant immune response. Furthermore, the results indicate a region within the SUAM molecule, having an important role in the proposed pathogenic mechanism. Bovine immunization with the vaccine prototype indicate that both proteins, formulated with the adequate adjuvant, can generate an immune response that is promising for future trials of vaccines to *S. uberis* IIM.

Capítulo I: Introducción a la mastitis bovina

I. 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1.1 Mastitis bovina

La mastitis es una enfermedad compleja que se define como una inflamación de la glándula mamaria, y es una de las enfermedades más perjudiciales de las vacas lecheras en todo el mundo. La mastitis bovina generalmente surge como resultado de una infección intramamaria (IIM) causada por microorganismos pero también puede ser ocasionada por una lesión y, menos frecuentemente, por alergia (Menzies y col., 2001). La principal fuente de IIM son las bacterias. Los factores que conducen a la mastitis pueden definirse como factores predisponentes (es decir, que aumentan la susceptibilidad del hospedero, como la edad o la función inmune), factores del hábitat (que facilitan la IIM como el tipo de sistema de crianza o nutrición), factores causales (es decir, los agentes infecciosos asociados con mastitis) y los factores que refuerzan (factores que agravan la mastitis como el sistema inmune deprimido o la exposición recurrente al patógeno) (Mc Dougall y col., 2009).

La mastitis no sólo afecta económicamente a los tamberos, sino también la imagen del sector lácteo, en relación al bienestar animal. Tiene importancia con respecto a la calidad de la leche y sus consecuencias en la Salud Pública. Esto se debe al uso inadecuado de antimicrobianos que acarrearán la aparición de residuos en la leche y de bacterias resistentes (De Vliegher y col., 2012).



Figura.1. Mastitis bovina, glándula mamaria de un animal padeciendo infección intramamaria, se pueden observar algunos síntomas, como edematización y enrojecimiento. Tomado de http://webtest.altagenetics.com/colombia/DairyBasics/Details/3015_Como-se-desarrolla-la-mastitis-en-la-ubre.html

I.1.2 Susceptibilidad a infecciones intramamarias

Varios factores influyen en la susceptibilidad a infecciones en el ganado lechero, estas pueden ser de origen fisiológico, genético, del patógeno, así como del medio ambiente.

Edad de los animales, se ha demostrado en IIM por *S. aureus* y *E. coli* que la frecuencia de aparición de la mastitis aumenta con la edad de los animales, siendo la más alta a los 7 años de edad (Tiwari y col., 2013). Esto puede ser debido a un aumento de la respuesta celular a la IIM o debido a daños en el tejido de la ubre resultante de una infección primaria. Una mayor eficiencia de los mecanismos de la inmunidad innata de los animales más jóvenes los hace menos susceptibles a la infección (Dulin y col., 1988). En contraposición a estas observaciones, la mastitis por *S. uberis* no tiene variación con la edad de los animales, aunque hay una tendencia a ser mayor en animales menores a 2 años (Mc Dougall y col., 2009).

Características hereditarias de las especies bovinas, varios rasgos genéticos también pueden tener un impacto considerable sobre la susceptibilidad del animal a la mastitis. Estos rasgos genéticos incluyen la resistencia natural, la forma y la conformación del pezón, el posicionamiento de las ubres, la distancia relativa entre los pezones, la producción de leche y los niveles de grasa de la leche (Tiwari y col., 2013). La selección genética para maximizar la producción de leche, en la cual se enfatizó durante años, ha aumentado el estrés metabólico asociado a la síntesis y la secreción de leche y existe una correlación negativa entre la capacidad de producción de leche y la resistencia a la mastitis (Sordillo 2005).

Etapa de la lactancia, la incidencia de la mastitis es mayor durante el período seco, después del parto y la lactancia temprana, especialmente en las primeras 2-3 semanas (Dufour y col., 2013, Tiwari y col., 2013), debido probablemente a un mayor estrés oxidativo y a la reducción de los mecanismos de defensa antioxidantes durante la lactancia temprana (Joksimović Todorović y col., 2013). Esto se debe a que, durante la preñez, el estrés fisiológico asociado a la rápida diferenciación del parénquima secretor, el intenso crecimiento de la glándula mamaria y el comienzo de la síntesis de leche, están acompañados por una alta demanda de energía que incrementa los requerimientos de oxígeno (Sordillo 2005). Esto ocasiona una sobreproducción de reactantes derivados del oxígeno conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), ocasionando lesión tisular en una situación de estrés oxidativo. Durante el preparto hay un desbalance entre la disponibilidad de enzimas antioxidantes y las ROS, que resulta en un incremento del estrés oxidativo (Sordillo 2005). Un aumento en el número de células somáticas (SCC, del inglés Somatic Cell Count) que son principalmente neutrófilos, se observa en el parto e inmediatamente después del parto, que sigue siendo elevado durante unas pocas semanas más independientemente de la presencia o ausencia de la infección (Barkema y col., 1999). El elevado número de SCC alrededor del parto fue asociado a una mayor susceptibilidad a infecciones (De Vliegher y col., 2005). La reducción de los mecanismos de defensa durante la preñez se relaciona con la presencia de hormonas asociadas al estrés, producidas en este período, como cortico-esteroides, cambios en progesterona, estradiol, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1 del inglés Insulin-like Growth Factor), y la hormona del crecimiento, las que ocasionan una alteración de las funciones de los neutrófilos y linfocitos (Sordillo 2005). Además, una considerable acumulación de líquido se produce dentro de la glándula mamaria, próximo al parto, causando aumento de la presión intramamaria. Durante este período la glándula mamaria es susceptible a infecciones, en parte debido a la dilatación del canal del pezón y las fugas de secreciones mamarias (Sordillo y col., 2002).

Máquinas Ordeñadoras, los factores tales como malos hábitos de ordeño de los tamberos y las fallas en las máquinas de ordeño, favorecen la entrada de los patógenos a la glándula mamaria, que pueden ocasionar IIM. Durante el empleo de máquinas para ordeñar

se produce vacío y una presión adecuada sobre el pezón, que puede conducir a una lesión si esas presiones no son controladas (mayor a 50 KPa) (Sordillo 2005, Tiwari y col., 2013).

Nutrición, la calidad y el plan de nutrición es un factor importante que influye en la manifestación clínica de la mastitis en vaquillonas y vacas (Tiwari y col., 2013). Mantener un balance adecuado de proteína y energía se relaciona con animales saludables, a expensas de un sistema inmunológico funcional (Heinrichs y col., 2009). Los requerimientos de vitaminas y minerales en vaquillonas lecheras están influenciados por la tasa de crecimiento y el peso corporal en relación al tamaño.

El selenio y la vitamina E mejoran la actividad fagocítica y se han asociado con una disminución del riesgo de mastitis clínica (Zigo y col., 2014). Ambos mejoran la función de los neutrófilos, así como su propiedad fagocítica después del parto (Hogan y col., 1990, Hogan y col., 1992). La vitamina E se combina a menudo con el selenio, que actúa como un anti-oxidante mediante la prevención de estrés oxidativo (Weiss y col., 1990). El cobre tiene funciones antioxidantes y puede reducir la mastitis clínica en vaquillonas. El zinc y el cobre también contribuyen a la salud de la glándula mamaria mediante la promoción de la reparación celular, cicatrización de heridas, reducción de SCC y mantenimiento de la integridad de las barreras epiteliales (Spears y col., 2008, Heinrichs y col., 2009). La vitamina A y los β -carotenos ayudan en el mantenimiento de la integridad de las superficies mucosas, los β -carotenos también pueden tener propiedades antioxidantes (Spears y col., 2008, Heinrichs y col., 2009, Tiwari y col., 2013).

El tiempo, el clima y ambiente, la incidencia de la mastitis está fuertemente influenciada por las condiciones climáticas vigentes. El calor, la humedad, el frío y los vientos son factores predisponentes importantes (Tiwari y col., 2013). Una mayor incidencia de mastitis se ha reportado durante el verano y meses de lluvia (Fox 2009). A medida que aumenta el calor y la humedad, se favorece la multiplicación bacteriana, así como la carga de patógenos en el medio ambiente. Además, el encierro de una gran cantidad animales por unidad de área, sumado a que las camas de los animales constituyen un soporte para el crecimiento bacteriano, también contribuyen a una mayor susceptibilidad a IIM (Sordillo y col., 2002).

I.1.3 Desarrollo de la enfermedad

I.1.3.1 Anatomía de la glándula

La ubre de la vaca lechera consta de cuatro glándulas mamarias. Cada uno de estos cuatro complejos glandulares es completamente independiente, con su propia estructura secretora y se comunica con el exterior a través de su propio pezón. El interior de cada cuarto está compuesto por la cisterna del pezón, cisterna de la glándula, ductos de leche y tejido glandular (Figura 2A). El tejido glandular contiene millones de bolsas microscópicas llamadas alvéolos (Figura 2A2). Cada alvéolo está rodeado de células epiteliales que producen leche, que a su vez están rodeadas de células musculares que se contraen y expulsan leche de los alvéolos durante el ordeño (Figura 2A2).

I.1.3.2 Etapas de la enfermedad

La glándula mamaria es invadida por los microorganismos siguiendo la vía del conducto del pezón, ocurriendo en términos de tres etapas: invasión, infección e inflamación y como consecuencia, la aparición de la mastitis.

Etapas de invasión; es aquella en la que el microorganismo pasa del exterior al interior de la ubre, raramente la vía de entrada es hematológica. La invasión del pezón se presenta generalmente durante el ordeño, cuando existe una entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño, que permite a los microorganismos ser impulsados dentro del canal del pezón y de la cisterna. Luego del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcial o permanentemente abierto (Rainard y col., 2006). Los microorganismos del ambiente o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del pezón, pueden invadir la glándula fácilmente (Figura 2B1). El microorganismo una vez ingresado se adhiere a la superficie epitelial y posteriormente la invade, este mecanismo está presente en varios microorganismos causantes de IIM (Calvinho y col., 1998).

Etapas de infección; este es el momento en que los microorganismos se multiplican rápidamente y se diseminan por toda la glándula, dependiendo de la patogenicidad de los mismos (Figura 2B). Algunas bacterias pueden avanzar dentro de la ubre atacando y

colonizando nuevos tejidos; otras pueden moverse por medio de la corriente de leche producida. En el estadio temprano de infección se puede observar un incremento gradual de monocitos y neutrófilos (Pedersen y col., 2003).

Etapa de inflamación; las toxinas bacterianas, enzimas y componentes de la pared celular, producen un efecto dañino sobre el tejido epitelial que recubre los grandes tubos colectores de leche, también estimulan la producción de mediadores de la inflamación (Harmon 1994), que producen un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Figura 2B3). Durante este proceso, los leucocitos reclutados liberan sustancias que atraen a más leucocitos desde el torrente circulatorio hacia la leche. Si las bacterias no son totalmente destruidas, pueden continuar multiplicándose y comenzar a invadir los pequeños conductos y áreas alveolares (Figura 2B4). El aumento de la permeabilidad además ocasiona incorporación de fluidos, minerales y factores de coagulación hacia dentro del área infectada, ocasionando cambios en la composición de la leche. Además, los coágulos formados por agregación de leucocitos y factores de la coagulación, producen una oclusión de los ductos intralobulares. En efecto, esto produce un aislamiento de las regiones infectadas, lo que deriva en una recesión funcional secretora de la glándula, resistencia a la terapia con antibiótico y, como consecuencia, la supervivencia de la bacteria en la región aislada (Figura 2C1) (Harmon 1994, Pedersen y col., 2003, Bedolla 2008).

Destrucción del tejido alveolar; algunas veces los microorganismos son eliminados rápidamente y la infección se resuelve. En este caso, los conductos tapados se abren y la composición y producción de leche y la glándula retornan al estado normal en varios días (Figura 2A). En cambio si la infección persiste y los conductos se mantienen tapados, las células secretoras pasan a una etapa de suspensión (sin producir) y el alvéolo comienza a reducir su tamaño. Las sustancias liberadas por los leucocitos conducen a una destrucción completa de las estructuras alveolares, que son reemplazadas por tejido conectivo (Figura 2C2 y D). La destrucción del tejido secretor de leche es un mecanismo de defensa de la vaca para mantener a la infección bajo control. Estos cambios histológicos en la diferenciación de células epiteliales alveolares, alteran la producción de leche futura (Harmon 1994, Sordillo 2011).

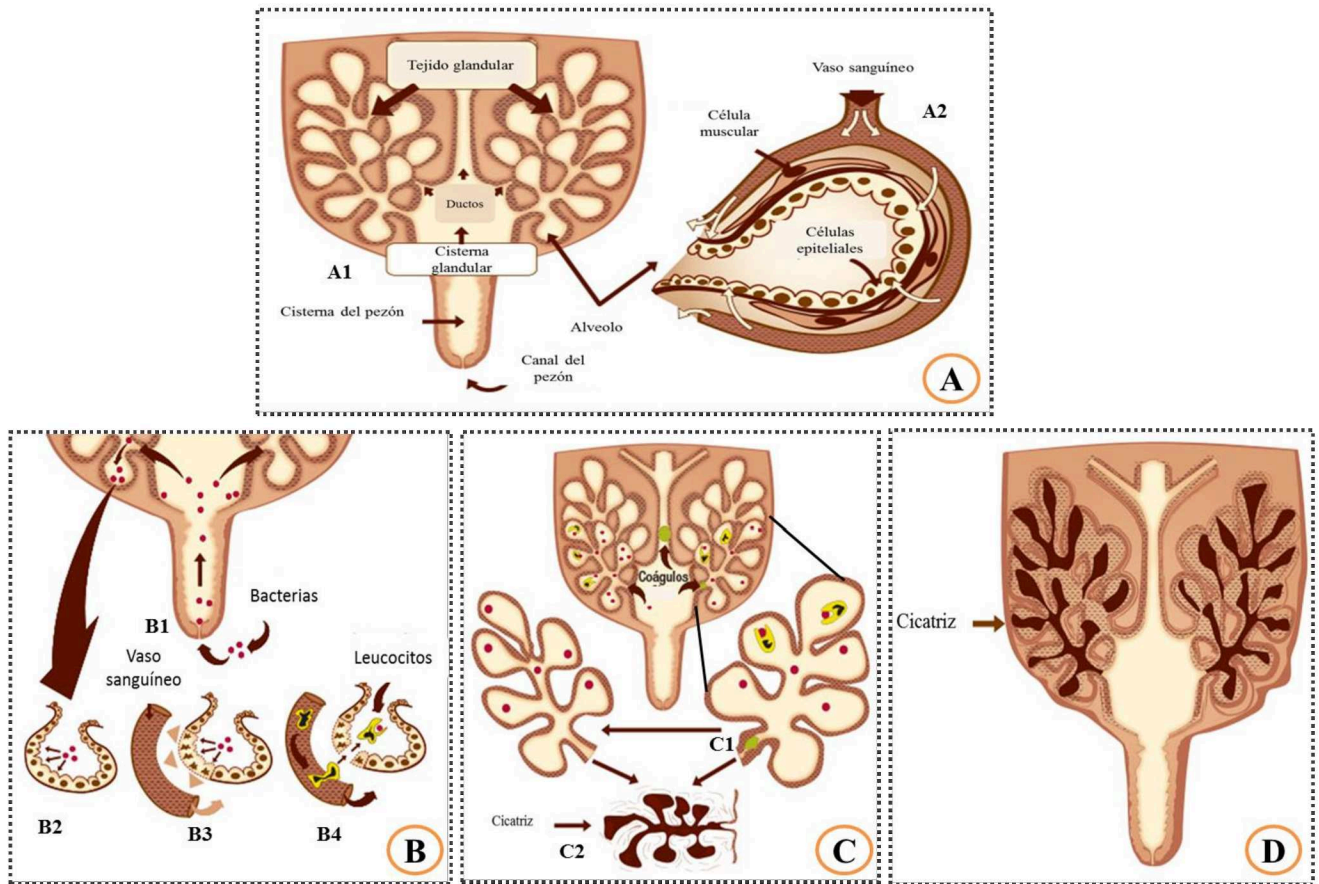


Figura.2. Estructura esquemática de la glándula mamaria y etapas del desarrollo de la enfermedad.

Estructura de la glándula mamaria normal (A). Durante la etapa de la invasión (B), las bacterias (puntos rosados) deben pasar a través del epitelio queratinizado del canal del pezón. Estas barreras físicas son componentes de la inmunidad innata. En la etapa de la infección (B), las bacterias se establecen dentro del tejido mamario (B-C). En esta etapa los mediadores de la respuesta inmune innata y adquirida (macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales, linfocitos, anticuerpos y citocinas) defienden en contra de este proceso, y la eficacia de estas respuestas, determina la susceptibilidad mastitis. En la etapa final, una vez que se ha establecido la infección, la inflamación, con un aumento del recuento de células somáticas, y los signos clínicos de la infección, se hacen evidentes (C). Si la infección progresa y no puede ser resuelta se produce una cicatrización de tejido alterando su estructura histológica normal (D). Adaptado de http://webtest.altagenetics.com/colombia/DairyBasics/Details/3015_Como-se-desarrolla-la-mastitis-en-la-ubre.html

I.1.4 Clasificación de tipos de mastitis

La Federación Internacional de Lechería en 1967, basándose en la presencia de microorganismos en la leche, en la intensidad de la respuesta inflamatoria en los signos clínicos, definió los distintos tipos de mastitis para el ganado bovino, en **mastitis subclínica** y **mastitis clínica** (Tardáguila Morales y col., 1999).

Mastitis Subclínica (MSC); es considerada el tipo más frecuente de IIM y es la causante de importantes pérdidas económicas en establecimientos lecheros ocasionadas por la disminución de la cantidad y calidad de leche. Se estima que por cada caso de mastitis clínica existen entre 15 a 40 casos subclínicos (Schalm 1971, Pinzón 1989). En la MSC tanto la ubre como la leche poseen un aspecto normal. En estos casos es muy utilizada la medida del SCC, en donde su aumento es un signo de inflamación y está fuertemente correlacionado con el aumento de probabilidad de IIM (Erskine y col., 1988, Dohoo y col., 1991, Schukken y col., 2003). El umbral de SCC en leche utilizado para diferenciar la secreción de leche de un cuarto mamario con o sin mastitis es de 200 000 células/ml.

Mastitis Clínica (MC); se caracteriza por la presencia de anormalidades visibles macroscópicamente en la ubre y/o en leche. Pueden observarse cuartos enrojecidos e hinchados, o bien palpase endurecimientos así como la presencia de signos sistémicos como fiebre o pérdida de apetito (Piepers y col., 2009). Según el grado de severidad, una clasificación clásica de las mastitis clínicas es en sus formas subaguda, aguda e hiperaguda, que van desde una inflamación con síntomas leves sin signos sistémicos, hasta una forma muy poco frecuente de inflamación mamaria caracterizada por aparecer muy rápidamente y que incluso puede ocasionar la muerte del animal (Chaves 2009).

I.1.5 Mastitis en vaquillonas

La mastitis en vaquillonas fue inicialmente descrita en 1942 por Schalm (Schalm 1942), pero 25 años más tarde fue considerada un problema relevante para la industria láctea (Oliver y col., 1983). La incidencia de IIM en vaquillonas al pre- o post-parto varía según los estudios entre 39% y 74,6% (Fox 2009, De Vlieghe y col., 2012). La mastitis, particularmente en vaquillonas, es una enfermedad importante, debido a que los animales con IIM sufren secuelas histológicas (reducción del epitelio alveolar y área luminal así

como un incremento del tejido conectivo). Posteriormente, estas secuelas influyen negativamente en la producción lechera (De Vliegher y col., 2008, Piepers y col., 2009), predisponiendo a nuevas IIM e incluso pueden disminuir la vida útil del animal en el tambo, llevándolos al sacrificio (De Vliegher y col., 2012). Si bien el ordeño es uno de los principales factores de riesgo para mastitis en vacas adultas, estos animales nunca han sido ordeñados, por lo cual se cree que uno de los motivos de las infecciones, es la disminución de la inmunidad de la glándula mamaria en este período (Oliver y col., 1988). La presencia de IIM al parto está altamente asociada a las prácticas de manejo de la ternera y la vaquillona; por lo tanto, estas prácticas son determinantes de la aparición de IIM subclínicas y clínicas al pre-parto (Camussone 2014).

Una revisión de trabajos publicados entre los años 1983 y 2010 reportó que en la mayoría de los estudios, la segunda causa de IIM en vaquillonas al pre-parto, post-parto y en los primeros días de lactancia, son los patógenos ambientales, siendo la primera los estafilococos coagulasa negativos (ECN) (Fox 2009, De Vliegher y col., 2012). En un estudio se describió que la incidencia de IIM por *Streptococcus uberis*, si bien no es afectada significativamente con la edad, es mayor en animales menores de 2 años, mientras que las IIM por *Staphylococcus aureus* aumentan a medida que aumenta la edad de los animales (Mc Dougall y col., 2007). También se determinó que *S. uberis* es el microorganismo más común en vaquillonas al pre-parto causando ambos tipos de mastitis (MSC y MC) (Compton y col., 2007).

La localización geográfica tiene un efecto importante sobre la prevalencia de los microorganismos causantes de IIM, influenciado por los efectos climáticos y diferentes manejos de los animales en cada región. Unos de los últimos estudios de prevalencia en vaquillonas en Argentina mostró que sobre un total de 1120 muestras de leche existe una mayor incidencia tanto al pre-parto como post-parto de ECN, seguido por *S. aureus* y estreptococos, siendo *S. uberis* la especie prevalente en este último grupo (Calvinho y col., 2007). Los ECN se consideran patógenos menores, convirtiéndose en patógenos oportunistas capaces de provocar una leucocitosis intramamaria significativa que se asocia con daño del parénquima mamario en vaquillonas (Nickerson y col., 1995). En otros estudios, los estafilococos coagulasa positivos y estreptococos ambientales son persistentes

durante la lactación y generalmente se relacionan con grandes pérdidas en la producción (Fox 2009).

I.1.6 Patógenos bacterianos causantes de mastitis bovina

Las bacterias que frecuentemente causan mastitis pueden dividirse en dos grandes grupos en función de la fuente bacteriana: patógenos contagiosos y patógenos ambientales. Dentro del grupo de los patógenos contagiosos, los principales son: *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* y *Mycoplasma* spp. Los principales patógenos ambientales incluyen dos tipos de bacterias: especies de estreptococos que no sea *S. agalactiae* (denominados comúnmente como estreptococos ambientales) y bacterias coliformes (Todhunter y col., 1995).

I.1.6.1 Mastitis por *Streptococcus uberis*

Estudios epidemiológicos demuestran que la prevalencia de mastitis en Argentina es del 58 % (Chaneton y col., 2008). El principal patógeno ambiental causante de mastitis es *S. uberis* el cual está asociado con IIM subclínicas y clínicas tanto en periodo de lactancia como en vacas no lactantes (Odierno y col., 2006). *S. uberis* representa aproximadamente el 90 % de los casos totales de mastitis por estreptococos del medio ambiente, en vaquillonas, dentro de los primeros 5 días de lactancia (Douglas y col., 2000).

El *S. uberis* es un coco Gram positivo, de 0,5 a 1 μm de diámetro, se observa formando pares o cadenas, aerotolerante y anaeróbico. En placas de agar sangre crece a 30-37 °C y forma colonias de 1 a 2 mm de diámetro, luego de la incubación de 24 a 48 hs. Puede ser α - o γ - hemolítico. Serológicamente es una especie heterogénea (Kromker y col., 2014). La fuente de este microorganismo es el suelo, el material de camas, y las heces, así como de varias zonas de la vaca tales como la piel y la ubre (Smith y col., 1993). Siendo estas últimas las principales fuentes de infección (Khan y col., 2003). Además, *S. uberis* puede aislarse de numerosos sitios incluyendo el vientre, labios, pezones, las vías urogenitales, las amígdalas, el recto, rumen, nariz, ojo y pliegues caudales (Khan y col., 2003).

I.1.7 Alteraciones en mastitis por *S. uberis*

Las alteraciones producidas en una infección por *S. uberis* fueron estudiadas en un modelo bovino, el cual fue similar y extrapolable a una infección natural. Se observaron signos clínicos de inflamación luego de las 4 hs de la inoculación con una respuesta máxima a las 11 hs. En leche se observó un recuento de SSC a las 8 hs y una secreción amarillenta a las 12 hs post-infección. En sangre se observó una declinación de monocitos y neutrófilos a las 5 hs post-inoculación, observándose su nivel mínimo a las 9 hs. Graves lesiones se observaron a partir de las 4 hs post-infección: edema subcutáneo, los ganglios linfáticos mamarios e inguinales aumentaron cinco veces respecto al tamaño normal. En los cambios histológicos se destaca un incremento de neutrófilos en el tejido conectivo intra-lobular, ductos y acinos secretores de leche (Pedersen y col., 2003, De Greeff y col., 2013). A las 8 hs se destacó el edema, los depósitos de fibrina en los ductos y necrosis focal del epitelio tanto en ductos como en alvéolos (Pedersen y col., 2003). La rápida propagación de la bacteria y la instalación de la infección puede ser la explicación a la falta de métodos profilácticos y a la limitada eficacia de la terapia antibiótica local.

La mastitis produce grandes cambios en la composición de la leche, así como en su producción, la cual disminuye significativamente con respecto a animales no infectados. En dos estudios independientes, las pérdidas fueron estimadas en 1,6 kg/día (Grohn y col., 2004, Kester y col., 2015). La composición de la leche era diferente en la cantidad de lactosa entre los animales infectados y no infectados desde el día 3 post-infección hasta el día 6, mientras que no se observaron cambios mayores en la composición de proteína y grasa (Kester y col., 2015). Sin embargo, alteraciones en el metabolismo lipídico a nivel transcriptómico durante una infección con *S. uberis* fueron evidenciadas (Moyes y col., 2009). La enzima más afectada fue la lipoproteína lipasa. También se observó disminución de CD36, que participa en el transporte de ácidos grasos.

I.1.8 Medidas de Control para mastitis bovina

La mastitis ambiental afecta a todas las explotaciones lecheras y en general es el principal problema de la mastitis en las explotaciones lecheras modernas, ocasionadas por

el espacio reducido de cría de los animales. Las medidas de control establecidas por el Consejo Nacional de Mastitis (**NMC**, de sus iniciales en inglés National Mastitis Council) (Nmc 2011) son eficaces contra patógenos contagiosos, pero no resultan aptos en el control de patógenos ambientales (Zadoks y col., 2003, Calvinho 2005).

La prevención de la IIM es la mejor medida de control. Lógicamente, control y medidas preventivas deben centrarse o bien en la reducción del riesgo de infecciones al parto, el curado de IIM existente, o ambos (Mc Dougall y col., 2009). Por lo tanto, los cambios de gestión o medidas terapéuticas que atenúen los efectos de uno o más de los factores de riesgo pueden reducir la incidencia o prevalencia de mastitis en vaquillonas. El control de la mastitis ambiental se logra reduciendo la exposición de la punta del pezón a los patógenos ambientales y al maximizar la resistencia de la vaca a la infección intramamaria. Aquellas condiciones ambientales que pueden aumentar la exposición a estreptococos ambientales incluyen: hacinamiento, mala ventilación, inadecuada limpieza e higiene en general, de los animales o lugares de rodeo y parición. En general, la exposición se minimiza cuando todas las áreas del medio ambiente son limpias y secas. La resistencia a infecciones se maximiza al proporcionar un ambiente libre de estrés que minimiza la lesión de la punta del pezón (Calvinho 2005, Deb y col., 2013). Por otro lado, la alimentación con dietas equilibradas y en presencia de vitamina E y selenio, pueden estimular la producción de péptidos antimicrobianos en glándula mamaria (Hettinga y col., 2011, Tellez-Perez y col., 2012). La terapia con antibióticos durante la lactancia o el período seco es de poco valor en el control de la mastitis ambiental en rodeos lecheros, con la excepción de la prevención de la infección por estreptococos del medio ambiente durante el inicio del período seco (Smith y col., 1993). El tratamiento intramamario al pre-parto con antibiótico se ha propuesto como una manera simple y eficaz de controlar la mastitis en vaquillonas pero los efectos positivos a largo plazo en SCC y producción de leche no siempre ocurren, descartándose universalmente la recomendación de esta práctica.

I.1.9 Pérdidas económicas

La mastitis bovina es la enfermedad más costosa para la industria láctea en el mundo debido no sólo a causas relacionadas con la reducción de la calidad de la leche sino también

a las consecuencias sobre los animales y a los costos que ocasiona al productor en tratamientos y servicios veterinarios. Por otra parte, los antibióticos utilizados en el tratamiento de la mastitis no sólo provocan un impacto económico en la industria sino también en la Salud Pública (De Vlieghe y col., 2012). Esto último está relacionado con tratamientos prolongados que han llevado a la aparición de cepas resistentes y, por lo tanto, existe la constante preocupación por la presencia de éstas en la cadena alimentaria (Wattiaux 2001).

Los datos estimados por la Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) en 2012 (<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>) reportan que Argentina produce casi 37 millones de litros de leche anuales, ubicándose en el puesto 13 entre los mayores productores de leche del mundo. Esta cifra evidencia la relevancia que tiene, en términos económicos, la enfermedad en nuestro país. Los últimos datos reportados sobre las pérdidas en la producción de leche en Argentina muestran que las pérdidas por mastitis son $\geq 1,0$ US\$/vaca/día (Vissio y col., 2015), la estimación incluyó gastos por enfermedad, control y prevención.

I.1.10 Inmunidad de la glándula mamaria

Durante la respuesta inflamatoria el sistema inmune de la glándula mamaria (GM), es activado para eliminar el patógeno. La glándula mamaria está protegida por una variedad de mecanismos de defensa que forman parte de la inmunidad innata y adaptativa (Rainard y col., 2006).

I.1.10.1 Defensa anatómica

La punta del pezón se considera la primera línea de defensa contra la mastitis ya que ésta es la vía por la que patógenos invasores ingresan a la glándula mamaria. El pezón contiene una defensa física y sustancias antimicrobianas. Los músculos del esfínter, actúan como barrera física, mantienen el cierre hermético de la glándula entre ordeños y obstaculizan la penetración de bacterias. Un aumento de la permeabilidad del esfínter está directamente relacionado con aumento de la incidencia de mastitis (Sordillo y col., 2002). Otro componente crucial para el mantenimiento de la función de barrera de la punta del

pezón, es la queratina, ya que se observó que la eliminación de la queratina se ha correlacionado con una mayor susceptibilidad a la invasión bacteriana y la colonización (Capuco y col., 1994, Sordillo y col., 2002). La queratina deriva del epitelio estratificado escamoso (Figura 3) y su acumulación puede proporcionar una obstrucción física a las bacterias, durante el período no lactante, lo que dificulta su migración en la cisterna de la glándula. El tapón de queratina del pezón está compuesto por: (1) ácidos grasos esterificados y no esterificados (mirístico, ácido palmitoleico, y ácido linoleico) que ejercen una acción bacteriostática (Oviedo-Boyso y col., 2007) y (2) proteínas catiónicas asociadas, que pueden unirse electrostáticamente a patógenos causantes de mastitis, alterar sus paredes celulares, y hacerlos más susceptibles a la presión osmótica (Miller y col., 1992). Tanto el contenido de lípidos como de queratina varían durante el período de lactación, entre diferentes períodos de lactación y en el período seco de los animales.

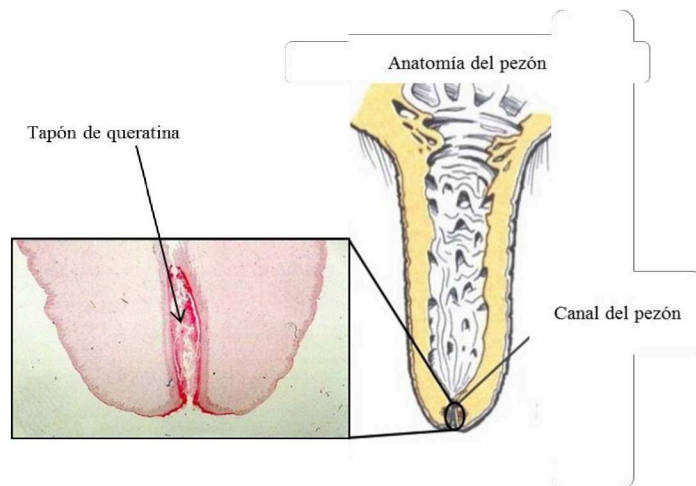


Figura.3. Estructura histológica del pezón, a la derecha se observa un corte transversal del pezón, y a la izquierda se observa una representación de un corte histológico de la punta del pezón, donde se observa la localización de la queratina producida por el epitelio estratificado. Fuente: Modificado de <http://www.nadis.org.uk/bulletins/teat-condition-scoring.aspx>.

Si las bacterias son capaces de superar la defensa anatómica presente en la punta del pezón, todavía deben evadir las actividades antibacterianas de la glándula mamaria a fin de establecer la enfermedad. La glándula mamaria coordina y opera la respuesta inmune innata y adaptativa para lograr una óptima defensa contra infecciones.

I.1.10.2 Componentes celulares de la inmunidad

Contribución del epitelio en la inmunidad Las células epiteliales mamarias (CEM) contribuyen activamente en la inmunidad innata y en la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria. Expresan receptores de reconocimiento de patrones (RRP) y principalmente receptores de tipo toll (TLR) (Alva-Murillo y col., 2012). En respuesta a una estimulación bacteriana las CEM secretan moléculas efectoras y mediadores inflamatorios de la inmunidad innata. Se observó que pueden secretar IL-8, y otros componentes de defensa como defensinas, metabolitos de ácido araquidónico y lactoferrina entre otras (Rinaldi y col., 2010, Smolenski y col., 2011, Alva-Murillo y col., 2012, Wellnitz y col., 2012, Ezzat Alnakip y col., 2014).

Leucocitos: cumplen un cierto grado de protección celular contra la invasión microbiana a través de su capacidad para reconocer microorganismos e inducir una respuesta inflamatoria rápida, en un intento por resolver la IIM velozmente. Por lo tanto, los leucocitos residentes en la glándula mamaria proporcionan una función de vigilancia en la glándula saludable. Además, estas células pueden ayudar en la reestructuración del tejido que se produce durante la involución (Barber y col., 1999). Las actividades de todos los tipos de leucocitos en la leche han demostrado ser reducidas en comparación con aquellos en la sangre (Ezzat Alnakip y col., 2014).

Neutrófilos. Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) constituyen la segunda línea de defensa contra IIM. Aún en condiciones saludables, los PMN están permanentemente en la glándula mamaria, y representan un 3-26% de las células con función antimicrobiana (Paape y col., 2000). Los neutrófilos bovinos cruzan el epitelio de la glándula mamaria por diapédesis sin causar daño a las células epiteliales (Lin y col., 1995) a menos que la migración sea extensa, en cuyo caso tanto el daño mecánico como químico son posibles (Akers y col., 2011). Es la primera célula inmune reclutada al sitio de infección (Mehrzhad y col., 2010). Los neutrófilos poseen una membrana con un número de receptores funcionalmente importantes: 1- moléculas de adhesión L-selectina y β 2-integrina, que promueven la unión a células epiteliales para facilitar su migración hacia el foco de infección y 2- receptor de la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG₂ e IgM y para C3b y iC3b (Ezzat Alnakip y col., 2014). Éstos median la primera función que cumplen los PMN

en la glándula, que es fagocitar al microorganismo. Se observó que luego de la migración de los PMN a la glándula mamaria aumenta la unión de IgG₂ mientras que disminuye la de IgM, siendo un 2% los PMN que unen IgM, esto sugiere que quizás IgG₂ tenga un rol más importante en la fagocitosis que IgM (Paape y col., 2003). Otra función de los PMN es contribuir a la modulación de la permeabilidad vascular y permitir la llegada de mediadores inflamatorios que juegan un rol crucial en la coordinación entre la inmunidad innata y adaptativa (Sordillo y col., 2002). Los PMN bovinos contienen 3 tipos de gránulos, 1- gránulos azurófilos, el componente microbicida más importante que contienen estos gránulos es la mieloperoxidasa (MPO), donde el sistema de defensa es mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-haluro (Paape y col., 2002); 2- gránulos específicos, contienen lactoferrina y otros componentes antimicrobianos y 3- gránulos primarios, específicos de bovinos, contienen β -defensinas, proteínas catiónicas altamente bactericidas (Paape y col., 2002, Syer 2010). Otro de los mecanismos bactericidas descritos es la formación de NET (del inglés, Neutrophil Extracellular Traps) (Grinberg y col., 2008).

Los PMN en leche se renuevan frente a estímulos como la lactación. Sin embargo, se observó que la fagocitosis de grasa de la leche, produce una alteración de los gránulos citoplasmáticos disminuyendo su actividad bactericida (Paape y col., 2002). También se observó que la fagocitosis de glóbulos de grasa, lleva a su degradación y generación de radicales hidroxilos, lo que puede dañar el epitelio mamario y de este modo alterar la actividad sintética de la glándula mamaria contribuyendo a las pérdidas de producción en caso de IIM (Ezzat Alnakip y col., 2014).

Previamente se observó que, a pesar del gran reclutamiento de PMN durante una infección por *S. uberis*, éste no puede ser fagocitado por PMN, tanto in vivo como in vitro (Leigh y col., 1994, Thomas y col., 1994, Rambeaud y col., 2003). En contraste con esta observación, en una infección experimental in vivo se observó que *S. uberis* es fagocitado tanto por neutrófilos como por macrófagos (Pedersen y col., 2003).

En el caso de los PMN frente a *S. uberis*, se observó que factores solubles producidos por una cepa virulenta en la leche altera el transcriptoma de un 94,8% de PMN. Esto ofrece una idea inicial sobre los mecanismos por los cuales *S. uberis* provoca cambios en los PMN

y que pueden estar relacionados con la inhibición de la función bactericida (Syer 2010). Además, se observó una disminución en la expresión de los genes pro-apoptóticos en los PMN expuestos al sobrenadante de cultivos de *S. uberis* en comparación con las de la leche no expuesta a *S. uberis* (Syer 2010). La importancia de los neutrófilos apoptóticos se debe a que atraen a los macrófagos, que los fagocitan. Esto promueve la resolución de la inflamación y la cicatrización de los tejidos mediante la prevención de la liberación del contenido citotóxico de los neutrófilos, a través de la regulación de las vías anti-inflamatorias en los macrófagos (Fox y col., 2010).

Macrófagos (Mf). Son derivados de monocitos de sangre que son diferenciados dentro de la glándula mamaria. Son el tipo de célula predominante en la leche representando un 35-79% de las células (Paape y col., 2003), y en los tejidos de glándula mamaria sana involucionada o en lactación (Ezzat Alnakip y col., 2014). En contraste con los neutrófilos, los macrófagos tienen un gran núcleo en forma de herradura que dificulta su migración entre las células endoteliales (Paape y col., 2000). Los macrófagos facilitan tanto la respuesta inmune innata como adquirida a través de varias funciones específicas y no específicas. Contribuyen a la generación de la respuesta inmune a través del procesamiento de antígenos y presentación a los linfocitos en asociación con moléculas MHC (Fitzpatrick y col., 1992). Similar a PMN, los macrófagos pueden realizar una variedad de funciones no específicas como la ingestión y fagocitosis de partículas extrañas, incluyendo bacterias invasoras, destruyéndolas con proteasas y especies reactivas de oxígeno (Denis y col., 2006). Además, pueden ingerir los desechos celulares y componentes de la leche acumulados en la glándula mamaria involucionada (Ezzat Alnakip y col., 2014). Otras funciones de los macrófagos mamarios consisten en secretar sustancias que faciliten el reclutamiento de neutrófilos fagocíticos, y secretar moléculas pro-inflamatorias (leucotrienos, prostaglandinas y citoquinas) (Sordillo 2005). La actividad fagocítica de los macrófagos puede incrementarse en presencia de anticuerpos opsonicos. En el ganado vacuno, los macrófagos de la glándula mamaria expresan receptores para IgG₁ e IgG₂ (Grant y col., 1996). A diferencia de los neutrófilos, los macrófagos poseen menos receptores Fc, lo que disminuye su capacidad de fagocitosis (Sordillo 2005). Los macrófagos de glándula mamaria son menos eficaces para la fagocitosis en comparación

con los monocitos de sangre, porque hacen ingestión indiscriminada de componentes de la leche (Denis y col., 2006, Ezzat Alnakip y col., 2014). Para el caso de *S. uberis*, se ha reportado que poseen la capacidad para fagocitar y matar a este microorganismo y tanto la IgG₁ como la IgG₂ tienen un rol en la fagocitosis por macrófagos (Grant y col., 1996). Se ha demostrado que la actividad bactericida de macrófagos de glándula mamaria puede variar en diferentes etapas, macrófagos de secreción en período seco ejercieron mayor actividad bactericida que los macrófagos de la lactancia. En el período seco y no en el período de lactación, se observó que son capaces de matar a *S. uberis*, y un estímulo con IFN- γ incrementa la liberación de TNF- α y productos bactericidas, por lo tanto la alta incidencia de infecciones en el período seco no estaría asociada a una falta de actividad de los macrófagos (Denis y col., 2006). Una falta de eficiencia de la eliminación *S. uberis* después fagocitarlo, durante el período lactante, puede favorecer la multiplicación intracelular en macrófagos (Denis y col., 2006).

Linfocitos. Los linfocitos reconocen una variedad de estructuras antigénicas a través de receptores de membrana, que definen sus características de especificidad, diversidad y de memoria. Los linfocitos están divididos en dos clases T y B, representando un 10-24% de las células de la inmunidad en la glándula mamaria (Paape y col., 2000).

Una de las principales funciones de los **linfocitos B** es producir anticuerpos contra los patógenos invasores. Los linfocitos B usan sus receptores de membrana para reconocer patógenos específicos, funcionan como células presentadoras de antígeno de la misma manera que las células dendríticas y los macrófagos, internalizan, procesan y presentan el antígeno a los linfocitos CD4⁺ (Oviedo-Boyso y col., 2007). A diferencia de los linfocitos T, los porcentajes de linfocitos B se mantienen bastante constantes independientemente de la etapa de lactancia o la infección (Shafer-Weaver y col., 1996).

Las **células NK** son linfocitos grandes granulares que poseen actividad citotóxica independiente de MHC, utilizan sus receptores para Fc para participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y mediada por célula (Sordillo y col., 2002, Rainard y col., 2006). Las células NK no requieren activación para matar las células que carecen MHC de clase I. Los estudios han demostrado la capacidad de las células NK para matar tanto Gram-

positivas como bacterias Gram-negativas (Sordillo y col., 2002, Ezzat Alnakip y col., 2014). Sordillo y col. establecen que las células T bovinas que poseen actividad bactericida directa sobre *S. uberis* pueden ser de la población $CD2^+CD3^-$ posiblemente un subconjunto de células NK (Sordillo y col., 2005).

Los **linfocitos T** se pueden clasificar según su TCR (receptor de células T) en linfocitos T $\alpha\beta$, que incluyen $CD4^+$ (T helper) y linfocitos $CD8^+$ (T citotóxico o T supresor), y las linfocitos T $\gamma\delta$ (Paape y col., 2000). En la glándula mamaria sana, las células T, principalmente $\alpha\beta$, presentan predominantemente el fenotipo $CD8^+$ lo cual está en contraste con la sangre, donde las células $CD4^+$ son la subpoblación predominante. Por lo tanto, la proporción de células T $CD4^+/CD8^+$ es más baja en la leche que en la sangre (Paape y col., 2000, Ezzat Alnakip y col., 2014). Las células T $\gamma\delta$ pueden mediar la citotoxicidad, de manera similar a las células NK, emigrando a las superficies epiteliales y desempeñarían un papel en la inmunidad antibacteriana proporcionando una función de barrera para el microambiente de la mucosa contra patógenos bacterianos (Paape y col., 2000). La subpoblación $WC1^+$ representa una porción menor de los linfocitos T $\gamma\delta$ en secreciones normales, aumenta notablemente después del parto y ejerce funciones inmunosupresoras (Guzman y col., 2012). Respecto a la actividad de los linfocitos T $CD8^+$, en la mitad de la lactancia exhiben actividad citotóxica y expresan principalmente $INF-\gamma$, mientras que durante el período post-parto, no se evidencia citotoxicidad y predomina la expresión de IL-4 (Sordillo y col., 1997, Shafer-Weaver y col., 1999). Estudios recientes han indicado un aumento significativo en la afluencia de células T asociado con mastitis, y la mayoría es del fenotipo activado/memoria, específicos para los patógenos causantes de mastitis (Wedlock y col., 2014). Frente a una infección por *S. uberis* se observó una expansión de células T $CD8^+ \alpha\beta$ que mostraron actividad bactericida significativa contra *S. uberis* in vitro (Sordillo y col., 2005, Denis y col., 2011). En contraste, las células T $CD4^+$ y células T $WC1^+\gamma\delta$ no mostraron actividad bactericida. Las células T $CD8^+$ son de importancia en la generación de resistencia a mastitis por *S. uberis* y *S. aureus*. Las células $CD4^+$ presentes en una infección por *S. uberis* son mayormente de un perfil Th1, liberando principalmente $INF-\gamma$ (Bannerman y col., 2004). Las respuestas inmunes tipo Th1 se caracterizan por la expresión de IL-2 e $INF-\gamma$, y la presencia de IgG_2 como

inmunoglobulina predominante. Por otro lado, la respuesta Th2 se caracteriza por la expresión de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 con anticuerpos del tipo IgG₁, (Brown y col., 1998, Estes y col., 2002). Durante el período del peri-parto, en respuesta al estrés, se secretan grandes cantidades de cortisol y otras hormonas esteroides a la sangre, que inducen la polarización de la respuesta a Th2, asociada a una mayor susceptibilidad a adquirir mastitis (Shafer-Weaver y col., 1999, Maeda y col., 2013). Otro perfil de importancia en la mastitis bovina es la respuesta Th17, donde la principal citoquina producida es IL-17 (Mensikova y col., 2013). En mastitis de vacas infectadas por estreptococos ambientales, se observó una sobreexpresión de IL-17 en leche durante el día de secado, 14 días después del secado y 5 días después del parto; pero durante el parto no se observó diferencia significativas entre infectadas y no infectadas (Bruno y col., 2010). La respuesta Th17 induce una respuesta antimicrobiana por las células epiteliales y recluta neutrófilos y CD, en glándula mamaria. Las células T reguladoras (Tregs), juegan un rol importante en la regulación negativa de la respuesta inmune, necesaria para mantener la homeostasia de la respuesta inmune y limitar la activación y la producción de autolesiones por las células efectoras (Miao y col., 2012). Los niveles de Treg se incrementan frente a una infección por *S. uberis* y al mismo tiempo disminuyen los niveles de ARNm de IL-2 e IFN- γ , la actividad de N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAGase) una enzima lisosomal y MPO, y el daño causado en la glándula mamaria por el microorganismo se ven minimizados (Miao y col., 2012).

I.1.10.3 Componentes solubles de la inmunidad

Citoquinas. Son péptidos solubles en agua producidos durante procesos inflamatorios. El perfil de citoquinas producido frente a un estímulo depende, en gran parte, de los receptores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) estimulados inicialmente. Entre ellos, los receptores de tipo toll: TLR-2 y TLR-4, son sobreexpresados frente a una infección por *S. uberis*. El camino de señalización vía TLR resulta en la síntesis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Moyes y col., 2009). Sin embargo, en otros estudios se observó solamente un incremento de la expresión de TLR-2 en el tejido mamario bovino con IIM por *S. uberis* (Swanson y col., 2009, De Greeff y col., 2013).

Numerosas citoquinas (por ejemplo, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-8 e IL-12) se han detectado en la glándula mamaria saludable, mientras que en la IIM se producen citoquinas específicas que actúan a nivel local y sistémico durante el inicio, progresión y resolución de la inflamación (Ezzat Alnakip y col., 2014).

Las citoquinas producidas en respuesta a una infección experimental con *S. uberis*, fueron evaluadas por microarrays de transcritos y cuantificadas por PCR cuantitativa a las 20 hs post-desafío. Este estudio mostró que las principales citoquinas que aumentan su expresión respecto a los animales no desafiados son: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 y TNF- α (Moyes y col., 2009). Por otro lado, Bannerman observó un incremento de IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12, TNF α e INF γ a las 30 hs post-desafío con *S. uberis* (Bannerman y col., 2004).

La IL-10, bloquea la activación de NF-k β , lo que produce la supresión de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Moyes y col., 2009). La IL-12, estimula a los LT y NK para que produzcan IFN- γ contribuyendo a la activación de macrófagos y neutrófilos, favorece la diferenciación de los LT al fenotipo Th1 y su proliferación (Trinchieri 2003). La IL-18 puede inducir la producción de IFN- γ por células T. Además, la IL-18 en combinación con la IL-12, puede inhibir el cambio de isotipo de las Ig dependiente de IL-4 (IgG₁) e inducir el cambio de isotipo a IgG_{2a} (Estes 1996, Moyes y col., 2009).

Las citoquinas inflamatorias IL-1 β , TNF- α y INF- γ pueden incrementar la capacidad fagocítica de los neutrófilos y/o su actividad bactericida. El TNF- α es producido en la etapa temprana de la infección y se propuso por este motivo utilizarlo como marcador de IIM (Alluwaimi 2004, Ezzat Alnakip y col., 2014). Estimula la secreción de IL-8, induce la expresión de moléculas de adhesión y la infusión de esta citoquina en forma recombinante en animales aumenta los niveles de IgG₁ y IgG₂ en leche (Alluwaimi 2004). El IFN- γ , al igual que la IL-12, sirve como mediador entre la inmunidad innata y adaptativa. Media la activación y la actividad microbicida de neutrófilos y macrófagos, induce la producción de IL-12, estimula la expresión de MHC clase I. Favorece la presentación antigénica por MHC clase II y la activación de células T CD4⁺ (Alluwaimi 2004, Oviedo-Boyso y col., 2007, Ezzat Alnakip y col., 2014).

La expresión de IL-8 previa a la aparición de signos clínicos, induce la estimulación de TNF- α e IL-1 β y juega un rol en la quimioatracción de PMN durante la respuesta inmune innata. La IL-1 β es una citoquina de fase aguda responsable de signos clínicos de la inflamación y respuesta febril en los animales, incrementa el reclutamiento de neutrófilos, estimula su propia secreción así como la de IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α (Rambeaud y col., 2003). La IL-6 facilita el intercambio de neutrófilos por monocitos en la glándula mamaria, necesario para disminuir los efectos deletéreos de los neutrófilos (Oviedo-Boyso y col., 2007). La sobre-expresión de IL-6 e IL-10, durante IIM con *S. uberis* sugiere una habilidad del sistema inmune para generar una respuesta pro-inflamatoria a través del camino de señalización de IL-6 y por otro lado intentar controlar la gravedad y la duración de la inflamación a través del camino de señalización anti-inflamatoria mediante IL-10. (Moyes y col., 2009). El rol de la IL-17 en la glándula mamaria se demostró mediante cultivos de células mamarias estimuladas con IL-17, donde observó un aumento de ARNm de IL-6, IL-8 y la expresión de citoquinas inflamatorias TNF- α e IL-1 β (Mensikova y col., 2013, Ezzat Alnakip y col., 2014). La IL-17 podría jugar un papel en el reclutamiento de neutrófilos en la glándula mamaria bovina durante la infección o inflamación mediada a través de la regulación de IL-8. Mejora la expresión de quimiocinas dirigidas a neutrófilos y leucocitos mononucleares como CXCL8, CXCL3, CCL2 y CCL20 (Mensikova y col., 2013, Ezzat Alnakip y col., 2014)

Inmunoglobulinas (Igs). Son los factores humorales solubles específicos más importantes de la inmunidad adaptativa vinculando el sistema inmune humoral y celular. Las Igs son el 70-80% de los componentes proteicos del calostro (Ezzat Alnakip y col., 2014). Los isotipos IgA, IgG₁, IgG₂ e IgM tienen un rol importante en la defensa contra patógenos bacterianos. Las IgG₁, IgG₂ e IgM actúan como opsoninas y facilitan la fagocitosis por PMN y macrófagos. Sin embargo, la IgM requiere de la fijación del complemento para lograr la fagocitosis efectiva por los PMN (Burton y col., 2003). La IgA tiene un rol fundamental en la neutralización de toxinas y aglutinación bacteriana, lo que obstaculiza la propagación de bacterias y la colonización de los tejidos (Butler 1983, Sordillo y col., 2002, Ezzat Alnakip y col., 2014). Las relaciones entre las concentraciones en calostro/sangre para IgG₁, IgA, y IgM son aproximadamente 4:1, 3:1 y 2:1,

respectivamente (Butler 1983). La más abundante de las clases de Ig en la leche bovina y el calostro de animales sanos es IgG₁, mientras que IgA e IgM están presentes en concentraciones más bajas. La IgG₂ aumenta sustancialmente en leche y calostro durante estados inflamatorios (Butler 1983, Sordillo y col., 2002). En condiciones inflamatorias, las IgG₁ e IgG₂ aumentan un 50% tanto en calostro como en leche (Guidry y col., 1980). La concentración de Igs varía durante el ciclo de lactación, aumentando en el último período (Butler 1983).

Las IgG e IgA derivan de sangre, mientras que IgM sería producida localmente en la glándula mamaria por células plasmáticas activadas provenientes del intercambio desde la sangre hacia la ubre (Wheeler y col., 2007, Verweij y col., 2014). Estas hipótesis derivan de la observación de que la disminución de los niveles de IgG₁ de sangre se corresponde con un aumento de los niveles presentes en leche, además de la observación de la expresión aumentada de la cadena β del receptor de IgG (FcRn), durante la calostrogénesis. Dicho receptor se localiza en la superficie basolateral de la célula epitelial secretoria y permite el transporte de IgG₁ por transcitosis a la glándula mamaria (Wheeler y col., 2007, Baumrucker y col., 2010). La glándula mamaria juega un rol activo en la regulación de los niveles de Igs presentes en calostro, ya que su desarrollo es regulado por estrógeno y prolactina, y esta última induce la expresión del receptor de IgG (Wheeler y col., 2007, Liu y col., 2009). Estos fenómenos no fueron observados para la IgG₂ (Baumrucker y col., 2010). La IgA se transfiere por el receptor polimérico de Ig (pIgR), ubicado en la membrana basolateral que libera IgA con un componente secretor en el lumen alveolar. Tanto la prolactina como los glucocorticoides regulan la expresión del receptor de IgA (Wheeler y col., 2007, Verweij y col., 2014)

Los niveles de IgG₂ aumentan con la presencia de una inflamación, como es en el caso de la mastitis, esto se debe a la transudación del suero, y es coincidente con el incremento de neutrófilos en glándula mamaria los cuales unen específicamente IgG₂. Esto permitió sugerir que la IgG₂ entra acoplada a los PMN (efecto citofílico) los cuales la liberan cuando son destruidos o alterados (Butler 1983).

Complemento. El sistema de complemento (SC) está presente en leche y en suero. Tiene un importante rol en la defensa de la glándula mamaria contra infecciones. Además, actúa como puente entre la inmunidad innata y adquirida. Las proteínas que componen el sistema de complemento son sintetizadas principalmente por los hepatocitos, y otras células extra hepáticas como macrófagos, células epiteliales y fibroblastos. La síntesis está regulada por citoquinas (IL-1 β , TNF- α o IL-6) y factores de crecimiento (Rainard 2003). El SC participa del inicio y control de la inflamación (C3a y C5a), opsonización de la superficie bacteriana y actividad bactericida (C3b y C4b), atracción y reclutamiento de fagocitos (C3a y C5a) (Rainard 2003, Ezzat Alnakip y col., 2014). La deposición del productos de clivaje C3b y C3bi sobre la bacteria favorece el reconocimiento por los fagocitos a través de la unión a receptores CR1 y CR3 respectivamente (Rainard y col., 2006). En glándula mamaria, las concentraciones más bajas de complemento se observan en la leche de glándula saludable durante la lactancia, y los niveles más altos se observan en el calostro, al final de la lactancia, y en las secreciones mamarias obtenidas durante la involución, presumiblemente debido a la movilización de los componentes del complemento desde la sangre (Ezzat Alnakip y col., 2014). Durante la mastitis, la exudación de plasma provee C1q, que está normalmente ausente en leche, favoreciendo el aumento de la concentración de C3 y aumentando la deposición de fragmentos C3 opsonicos (Rainard 2003, Rainard y col., 2006).

I.1.10.4 Otros componentes

Lactoferrina (LF). Es una glicoproteína de unión a hierro. En el ambiente de la glándula mamaria es principalmente producida por el epitelio secretor y en menor medida por PMN y Mf (Oviedo-Boyso y col., 2007). Los niveles de LF son inversamente proporcionales al desarrollo alveolar. Si bien en el calostro hay una gran cantidad de LF, ésta aumenta en la lactación. Se cree que su expresión está regulada en forma recíproca con otras proteínas de la leche, y está en relación inversa al desarrollo alveolar (Ezzat Alnakip y col., 2014). El incremento durante el período seco está relacionado con la inhibición del crecimiento de microorganismos lo que previene la incidencia de IIM (Harmon y col., 1976, Kawai y col., 1999). Su efecto bacteriostático se debe a la competición con los microorganismos por la disponibilidad de hierro. Otro mecanismo demostrado es el daño

que produce en membranas de bacterias Gram negativas debido a la unión al lípido A de LPS y la formación de poros alterando la integridad y la permeabilidad de la membrana (Ellison y col., 1988). En el caso particular de *S. uberis*, se reportó que induce la secreción de LF (Chaneton y col., 2008), cuyos niveles pueden incrementarse 30 veces respecto de los normales en una infección severa (Ezzat Alnakip y col., 2014). Sin embargo, *S. uberis* evolucionó para evadir esta acción bactericida (Moshynskyy y col., 2003). Esto le confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos que son susceptibles a la acción de LF, como *E. coli* (Chaneton y col., 2008). El *S. aureus* es resistente a la acción microbicida de LF pero es susceptible a la opsonización por C3b y C3bi (Oviedo-Boyso y col., 2007).

Otras proteínas y enzimas cumplen un rol en la defensa contra microorganismos como la **transferrina**, una proteína de unión a hierro que llega a la glándula mamaria sana desde la sangre o a través de la exudación del plasma durante las mastitis (Rainard y col., 2006). La transferrina aportaría una acción bacteriostática frente a los agentes patógenos durante el inicio de la infección (Rainard y col., 2006). La **lisozima** cliva el enlace β 1,4-glicosídico (Rainard y col., 2006) y puede ejercer una acción sinérgica con la LF sobre la pared celular de los microorganismos (Sordillo y col., 2002). Sin embargo, no es considerada un mecanismo de defensa significativo en la glándula mamaria (Rainard y col., 2006). La **lactoperoxidasa**, junto a la xantina oxidasa, son las enzimas más abundante en leche (Isobe y col., 2009). Promueven la actividad bactericida de los fagocitos a través de la generación de ROS (Rainard y col., 2006). Puede tener una acción complementaria en la función antimicrobiana con una β -defensina, como por ejemplo el péptido antimicrobiano lingual (LAP) (Isobe y col., 2009). La **mieloperoxidasa (MPO)** es un componente importante del sistema antimicrobiano dependiente de oxígeno de neutrófilos (Cooray y col., 1995). In vitro, este sistema ha demostrado ser potente contra los principales agentes patógenos de la glándula, tales como *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *E. coli* (Cooray y col., 1995). Las propiedades antibacterianas atribuidas a este sistema sólo son relevantes durante el período seco (Ezzat Alnakip y col., 2014).

I.1.11 Hipótesis de trabajo

La mastitis bovina, inflamación de la glándula mamaria, es la enfermedad más costosa de las vacas lecheras y representa un problema de gran impacto en la industria láctea. Entre las especies bacterianas causantes de mastitis bovina, *S. uberis* es ubicuo en el ambiente de la vaca lechera y está predominantemente relacionado a mastitis subclínicas. El desarrollo de vacunas contra patógenos causantes de mastitis ha sido lento, particularmente debido al prerrequisito de que la infección debe ser controlada sin inducción de una respuesta inflamatoria significativa, dado que ella misma contribuye a la condición de la enfermedad (Anderson 1978). Actualmente, las prácticas profilácticas que incluyen la terapia antibiótica y la desinfección del pezón han reducido al mínimo la propagación de las infecciones. Sin embargo, estas medidas son frecuentemente inadecuadas para este patógeno, simplemente porque los animales están constantemente siendo reexpuestos a la infección proveniente del ambiente que los rodea. Por consiguiente, hay un claro requerimiento del desarrollo de una vacuna para aumentar la eficacia de los métodos convencionales de prevención de infecciones por *S. uberis*. Si bien se han descrito diversos factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis de las infecciones por *S. uberis*, la importancia de muchos de ellos no se conoce bien. Recientemente, *S. uberis* ha sido identificado como un organismo altamente recombinante, con diferencias de genoma entre cepas de un 15% a un 18% (Lang y col., 2009). Muchos de estos genes variables están involucrados en la virulencia de la bacteria. Por lo tanto, esta gran variabilidad genética y diferencia de expresión de genes de virulencia entre aislamientos de *S. uberis* permite concluir que una vacuna con un único componente antigénico sería insuficiente para la prevención de infecciones por dicha bacteria. Entre estos factores, la proteína PauA ha mostrado propiedades como potencial inmunógeno protector (Leigh y col., 1999). En los aislamientos de *S. uberis* de la cuenca lechera central de Argentina la presencia del gen pauA fue reportada en un 66% (Reinoso y col., 2008). Sin embargo, y de interés a este proyecto, la presencia de este gen en otras regiones geográficas de Argentina y su polimorfismo no han sido estudiados. Otro candidato atractivo para la conformación de dicha vacuna es la molécula SUAM, dado que está involucrada en la adherencia, internalización y persistencia de *S. uberis* en células epiteliales mamarias bovinas (Almeida

y col., 2006a). Luther y colaboradores han demostrado la presencia de este gen en cepas de *S. uberis* aisladas de diferentes lugares geográficos del mundo sugiriendo su carácter conservado (Luther y col., 2008). No obstante, se desconoce la prevalencia y polimorfismo del gen que codifica para SUAM en aislamientos de nuestro país. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio epidemiológico de aislamientos de *S. uberis* y su relación con la presencia de los genes *pauA* y *sua* en las principales cuencas lecheras de nuestro país para el diseño racional de una vacuna para prevenir la mastitis por *S. uberis*. También será necesario estudiar el polimorfismo de dichos genes.

La hipótesis de este trabajo es que, dada la elevada variabilidad genética de *S. uberis* en sus genes de virulencia, la administración de una vacuna recombinante compuesta por dos antígenos permitiría inducir una respuesta inmunoprotectiva hacia un número mayor de cepas de *S. uberis* presentes en el ambiente capaces de ocasionar infecciones en la glándula mamaria de los bovinos. El trabajo propuesto contribuirá al desarrollo de una vacuna para prevenir la mastitis bovina por *S. uberis* en nuestro país. Asimismo, aportará información relevante acerca de la distribución clonal de los aislamientos de *S. uberis* y la expresión de sus principales factores de virulencia en las principales cuencas lecheras locales. El trabajo se llevará a cabo en tres etapas, en primer lugar se evaluará la diversidad clonal y la prevalencia y conservación de dos factores de virulencia que participarían en los estadios iniciales de la infección. En segundo lugar, se estudiará preliminarmente los anticuerpos obtenidos con dichos factores de virulencia en un modelo murino, para finalmente desarrollar un prototipo de vacuna multicomponente formulado con diferentes adyuvantes que será evaluado en bovinos.

Capítulo II:

Estudio genético- epidemiológico de *S. uberis*

II.1 MARCO TEÓRICO

Los casos de mastitis bovina durante los primeros días de lactación ocasionados por los aislamientos de *Streptococcus* spp. de origen ambiental representan el 12,2% de las infecciones intramamarias (IIM), de los cuales el 90% de los casos se deben a *S. uberis* (Douglas y col., 2000). A través de los años y con la implementación de las medidas establecidas por el National Mastitis Council (NMC) (NMC 2011), se logró disminuir la prevalencia de patógenos contagiosos, y el nicho ecológico fue ocupado por los patógenos ambientales. Así, la falta de conocimientos sobre la epidemiología de estos patógenos (Jayarao y col., 1991, Zadoks y col., 2003). Esta falta de control de las infecciones por *S. uberis* orientó el interés hacia el desarrollo de estrategias inmunoproliféricas. Los numerosos diseños inmunoproliféricos no resultaron exitosos debido en parte a la gran variabilidad genética de *S. uberis* (Lang y col., 2009), que implica con frecuencia una diversidad de patrones de factores de virulencia (Reinoso y col., 2011). En este contexto, los estudios epidemiológicos de las cepas regionales contribuyen al conocimiento de las fuentes de los microorganismos, las vías de transmisión, y el pronóstico después del tratamiento.

Los métodos de tipificación basados en el análisis de ADN de *S. uberis* comenzaron en 1989 (Hill y col., 1989, Groschup y col., 1991). En los primeros trabajos se observó una alta homología entre cepas (Zadoks y col., 2011). Sin embargo, a medida que se lograron optimizar las técnicas de tipificación molecular, se puso en evidencia una marcada heterogeneidad entre cepas de diversos lugares del mundo (Jayarao y col., 1991, Jayarao y col., 1992, Jayarao y col., 1993, Douglas y col., 2000, Rato y col., 2008a, Wang y col., 2013, Abureema y col., 2014). Estas evidencias permitieron clasificar a *S. uberis* como patógeno ambiental.

La electroforesis de campo pulsado (PFGE) es una técnica de tipificación genómica utilizada para una diversidad de microorganismos, entre ellos, bacterias Gram negativas y positivas, tanto de origen humano como animal (Skjold y col., 1987, Douglas y col., 2000, Soyer y col., 2010). Esta técnica se basa en el número de veces que se encuentra repetido el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción a lo largo del genoma. La elección de

la endonucleasa es un factor importante en el patrón de PFGE debido a que el sitio de clivaje es único para cada una. La longitud de dicho sitio y frecuencia con que se encuentra, es lo que determina la resolución del PFGE (Li y col., 2009). Para el caso de especies de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*, la endonucleasa utilizada es SmaI, cuyo sitio de reconocimiento es CCCGGG, el cual se encuentra poco representado en el genoma de estas bacterias, dada la pobreza en GC (Gordillo y col., 1993).

La PFGE es una técnica que posee alta robustez, presenta gran capacidad resolutive y alta reproducibilidad y, por sus características, es considerada una técnica de referencia (Stratton 2006). Sin embargo, requiere de mucho tiempo y equipamiento especializado. Estas desventajas han llevado al diseño de nuevas técnicas de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la RAPD-PCR, por sus iniciales en inglés **R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**N.A. Esta metodología fue descrita por Williams y col, su fundamento es amplificar aleatoriamente segmentos de ADN, en condiciones de baja astringencia (Williams y col., 1990). Como toda reacción enzimática presenta varios factores críticos, como son la calidad y la concentración del ADN molde, las concentraciones de componentes de la PCR y las condiciones de los ciclos de PCR, todos ellos afectando la reproducibilidad de los resultados. Es una técnica que presenta costos, tiempos y eficiencia razonables en comparación a otros métodos y puede ser aplicada en cualquier laboratorio. Por lo tanto, a pesar de su inconveniente de reproducibilidad, es importante considerarla en términos de costo, tiempo y mano de obra.

Ambas metodologías de tipificación fueron usadas para estudiar la epidemiología de *S. uberis*, así como de otros microorganismos (Feikova y col., 2007, Goering 2010). En Argentina, se ha reportado un único trabajo, que estudia la epidemiología de *S. uberis* mediante PFGE a partir de un número de aislamientos reducido y procedente de un único tipo de mastitis (Lasagno y col., 2011).

Se han descrito numerosos factores de virulencia de este patógeno, entre ellos, el activador del plasminógeno A (PauA) (Rosey y col., 1999) y la molécula de adhesión de *S. uberis* (SUAM) (Almeida y col., 2006a). El primero de ellos es una proteasa capaz de activar la plasmina, que a su vez, degrada las proteínas generando pequeños péptidos y

aminoácidos libres que son utilizados por las bacterias como fuente de nitrógeno. Este factor ha sido propuesto como un mecanismo patogénico de *S. uberis* dado que está relacionado con la colonización temprana de la glándula mamaria (Leigh y col., 1999). En cuanto a SUAM, está vinculada con la adherencia y la internalización de la bacteria, a través de su unión a lactoferrina (Patel y col., 2009), así como también con su persistencia en las células epiteliales mamarias bovinas (Almeida y col., 2006a). En Argentina, se observó previamente un patrón de distribución heterogéneo de los factores de virulencia hasta ahora descriptos para *S. uberis* entre cepas causantes de IIM (Reinoso y col., 2011). Esto permitió inferir que no hay un factor de virulencia asociado estrechamente a un tipo de mastitis. Más aún, puede estar dado por otros factores de virulencia aún desconocidos o incluso, influenciados por factores del hospedador (Reinoso y col., 2011). La amplia diversidad genética observada en *S. uberis* indica que la virulencia no se asocia con un tipo molecular específico (Wang y col., 1999). Por lo tanto, el tratamiento y la prevención de infecciones provocadas por este microorganismo deben dirigirse a una multitud de diferentes cepas presentes en el campo y en animales individuales. Durante mucho tiempo, la variabilidad genética de *S. uberis*, significó un impedimento para lograr una terapia inmunogénica. Sin embargo, actualmente esto puede superarse mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas basadas en el análisis de numerosas secuencias de ADN que codifican genes de potenciales factores de virulencia presentes en el genoma bacteriano.

II.2 OBJETIVO GENERAL

El estudio de la distribución de genes de virulencia junto con el análisis de sus secuencias permite proponer antígenos como potenciales componentes de una vacuna. La variabilidad antigénica en el diseño inmunoproláctico condiciona la selección de los candidatos vacunales. En este sentido es fundamental contar con estudios epidemiológicos de aislamientos regionales, ya que estos proveen información valiosa en la identificación de moléculas blanco para el desarrollo de agentes terapéuticos así como de vacunas profilácticas. Por lo tanto, el objetivo de esta etapa es: Estudiar la diversidad genética y relación clonal entre aislamientos de *S. uberis* obtenidos de mastitis clínicas y subclínicas de las principales cuencas lecheras argentinas.

II.2.1 Objetivos específicos:

Para poder arribar al objetivo general de este capítulo se implementaron los siguientes objetivos específicos.

- Estudiar aislamientos de *S. uberis* provenientes de diferentes regiones geográficas, que comprenden las principales cuencas lecheras del país, mediante técnicas de epidemiología molecular.
- Estudiar la distribución de los genes *sua* y *pauA*, que codifican para SUAM y PauA respectivamente, en esos aislamientos.
- Identificar las regiones conservadas de los genes *sua* y *pauA* mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.

II.3 MATERIALES Y MÉTODOS

II.3.1 Aislamientos bacterianos incluidos en este estudio

Los aislamientos recibidos, fueron recolectados en un período comprendido entre noviembre de 2010 y julio de 2012 de muestras de leche compuesta de vacas con mastitis clínica o subclínica provenientes de 35 campos ubicados en las principales cuencas lecheras Argentinas. La caracterización del tipo de infección (clínico y subclínico) fue realizada por Médicos Veterinarios, quienes remitieron las muestras de leche a los laboratorios de la Estación Experimental Agropecuaria de Rafaela y Lacto Diagnóstico Sur de Olivos. Las muestras fueron clasificadas como de casos de mastitis clínicas, cuando los aislamientos provenían de animales con secreción mamaria con alteraciones macroscópicas (coágulos en la leche) y signos inflamatorios (hinchazón, enrojecimiento, dolor en la ubre), mientras que las muestras de mastitis subclínica, procedieron de animales con secreciones mamarias sin alteraciones macroscópicas (ausencia de signos de inflamación clínica) pero con recuento de células somáticas superiores a 200 000 células/ml (I.R. Dohoo 1991).

La identificación de género se realizó en primera instancia en los laboratorios anteriormente mencionados, en base a las características morfológicas de las colonias, actividad hemolítica, tinción de Gram y prueba de la catalasa. La identificación bioquímica de especie de *Streptococcus* se realizó mediante las siguientes pruebas: hidrólisis de la esculina e hipurato de sodio, crecimiento en caldo NaCl al 6.5%, crecimiento en agar bilis esculina (ABE) y prueba de CAMP (ANEXO 2, tabla 1) (Odierno y col., 2006). Las muestras se preservaron hasta su uso a -70°C en caldo Tripteína Soya (Britania, Argentina) suplementado (ANEXO 1 inciso 1.1, 1) con el agregado de 15% de glicerol.

II.3.2 Extracción de ADN genómico de *Streptococcus uberis*

El ADN genómico de los aislamientos de *S. uberis* se purificó por el método descrito por Hill y Leigh (Hill y col., 1989) con modificaciones. Se partió de 3 ml de un cultivo crecido en fase estacionaria (16 hs a 37°C) y se centrifugó a 13 000 r.p.m durante 5 min. Para eliminar los restos de medio de cultivo se lavó el sedimento celular con 500 µl de

buffer TE (ANEXO 1 inciso 1.2, 1). La lisis bacteriana se realizó a través de resuspensión en buffer de ruptura de pared celular (ANEXO 1 inciso 1.2, 2) y posterior incubación a 37°C durante 30 min. La lisis celular se completó con el agregado de 20 µl de buffer de lisis (ANEXO 1 inciso 1.2, 3) y proteinasa K (Genbiotech SRL, Argentina) a una concentración final de 150 µg/ml e incubación adicional a 37°C durante 60 min. Los restos proteicos de la pared celular se eliminaron por precipitación, mediante el agregado de 200 µl de solución saturada de NaCl y posterior centrifugación a 13 000 r.p.m durante 10 min. El sobrenadante se extrajo con fenol-cloroformo-álcool isoamílico, se separó la fase acuosa y el ADN se precipitó con el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. El ADN precipitado se lavó con etanol 70% y se evaporaron los restos del mismo a temperatura ambiente 30 min, previo a la resuspensión en agua estéril. La cuantificación del ADN extraído se realizó espectrofotométricamente mediante lectura de absorbancia a 260 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Se evaluó la pureza de las mismas mediante la determinación de la relación de absorbancia a 260 nm /280 nm.

II.3.3 Cebadores utilizados

En la Tabla 1 se listan los cebadores específicos utilizados para llevar a cabo los experimentos de amplificación genómica y secuenciación, realizados en este capítulo. Para el diseño de cebadores se utilizó el programa PrimerSelect™ (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.) a partir de las secuencias disponibles en GenBank GU392692.1 y DQ232760.1, para pauA y sua respectivamente. Los cebadores diseñados se corrigieron manualmente para disminuir las probabilidades de formación de horquillas dentro de las secuencias y la dimerización de los oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Genbiotech SRL, Argentina.

Nombre	Secuencia	Referencia
16S 5'	5'-CCAAGCGCTCAGGACGAACGCT-3'	(Jayarao y col., 1992)
16S 3'	5'-CGGGATCCCGCCCGGGAACGTATTCAC-3'	
Ope-4	5'GTGACATGCC 3'	(Wieliczko y col., 2002)
sua 5'	5'-GTCATTTGGTAGGAGTGGCTG- 3'	(Luther y col., 2008)
sua 3'	5'-TGGTTGATATAGCACTTGGTGAC-3'	

PauA 5'	5'-GGATCCTTTTAAATATTAATGCTTTTG-3'	Este trabajo
PauA 3'	5'-GAGCTCCAGAAAAATTAATGGATAC-3'	
SUAM-2 5'	5':GAATTCACACAATCTGACGAGGT-3'	Este trabajo
SUAM-3 5'	5':GAATTCGAAGTTGGGGCATAAC-3'	Este trabajo
SUAM-4 5'	5':GAATTCCTCAAGTGCTCCGGTCT-3'	Este trabajo

Tabla.1. Secuencia de los cebadores utilizados. Se representa la secuencia de cada oligonucleótido y el origen de cada uno. Este trabajo: hace referencia a que fue diseñado en el marco de esta tesis.

II.3.4 Visualización de los productos de PCR en geles de agarosa

De acuerdo al tamaño del fragmento de ADN amplificado, se analizaron alícuotas de cada reacción de PCR (5-10 μ l) en geles de agarosa al 0,8%; 1%; 1,5% o 2%, en TAE 1X, pH 8 (ANEXO 1 inciso 1.3, 1) conteniendo 1 μ l de Bromuro de etidio (BrEt) (10 mg/ml). Las corridas electroforéticas se realizaron a 90V durante 40-120 min. Los geles se visualizaron por transiluminación bajo luz UV λ 255 nm (Fotodyne N3/3002). La determinación del tamaño de los amplificados se realizó por comparación con un marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder, Promega, EE.UU) (100 bp DNA Ladder, Productos biológicos, Argentina). La documentación de imágenes se realizó utilizando Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Sistem (BioRad Laboratories, Inc.).

II.3.5 Identificación molecular de especie

II.3.5.1 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La confirmación molecular de los aislamientos se llevó a cabo según la técnica descrita previamente por Jayarao y col. (Jayarao y col., 1992). Brevemente, esta técnica consistió en dos pasos, la amplificación del gen 16S de ARN ribosomal (ARNr) seguida de la digestión del producto amplificado con endonucleasas.

II.3.5.1.1 Amplificación del gen 16S de ARNr

La reacción de amplificación se realizó utilizando 150 ng de ADN genómico como molde en un volumen total de 100 μ l de mezcla de reacción. El tamaño de producto esperado fue

de 1600 pb. La PCR se realizó en termociclador Ivema T-18 (Ivema Desarrollos S.R.L., Argentina) bajo las siguientes condiciones de trabajo:

Mezcla de reacción		Programa de amplificación	
Reactivo	Concentración Final	Desnaturalización del ADN 5 min a 94°C	
dNTPs	0,1 mM c/u	35 ciclos de amplificación	
MgCl ₂	2 mM	Desnaturalización del ADN	90 seg a 93°C
16S 5'/16S 3'	0,5µM c/u	Hibridación de los oligonucleótidos	90 seg a 56°C
Buffer 5X	1X	Síntesis de ADN	90 seg a 75°C
GoTaq Promega	2,5 U	Elongación de cadenas 10 min a 72°C	
ADN (ng)	150		

II.3.5.1.2 Digestión enzimática del producto amplificado e interpretación de resultados.

El producto obtenido por amplificación se sometió a digestiones enzimáticas con las endonucleasas de restricción CfoI y RsaI (Promega®, EE.UU). Para ello, se prepararon mezclas de producto de PCR (ADN) (0,1-1 µg), Albúmina Sérica Bovina (ASB) (0,1µg/µl) y 15 U de enzima, en un volumen final de 50 µl y se incubaron durante 90 minutos a 37°C.

El producto de la digestión del gen 16S ARNr con CfoI, genera tres fragmentos de 280, 550 y 600 pb compatible con el grupo A definido por *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. mitis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. salivarius*, *S. equinus* y *A. viridans*. El patrón observado para el grupo B, definido por *E. saccharoliticus*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. avium*, se corresponde con la generación de cuatro fragmentos de 220, 280, 380, and 550bp.

Para diferenciar especies dentro del grupo A se realizó la digestión del producto amplificado 16S ARNr con RsaI. Como producto de la digestión se observa un fragmento de 200 pb presente en *S. uberis* y *S. parauberis*, y éstas se diferenciaron entre sí por la presencia de un fragmento a la altura de 240 pb para *S. uberis* y uno a la altura de 370 pb en *S. parauberis*.

II.3.6 Análisis epidemiológico de cepas de *S. uberis*

II.3.6.1 Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado

La tipificación consistió en hacer una macro digestión del ADN genómico bacteriano con la endonucleasa SmaI (Gordillo y col., 1993). La técnica se realizó en tres fases: 1) Extracción del ADN genómico bacteriano, 2) Digestión del ADN con SmaI, 3) Separación de los fragmentos obtenidos mediante un sistema de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

1-Extracción de ADN genómico

La extracción del material genómico se realizó a partir de un cultivo crecido durante 16 hs a 37°C en caldo Tripteína Soya (Britania, Argentina) suplementado (ANEXO 1 inciso 1.1,1). La masa celular obtenida por centrifugación (12 000 r.p.m, 25°C 2 min) de 1 ml de cultivo, se resuspendió en 200 µl de Buffer PIV (ANEXO 1 inciso 1.4, 1). A esta suspensión, se le midió la densidad óptica a 620 nm (DO_{620}). Este valor se utilizó para calcular el volumen de solución PIV que se debía agregar a la suspensión para que todas las muestras alcancen una $DO_{620}=5$.

Luego de agregar el volumen calculado de PIV, 200 µl de cada suspensión bacteriana se mezcló con 200 µl de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (BioRad) al 1,5%, ambas precalentadas a 41°C. Posteriormente se realizaron gotas (“plugs”: ADN embebido en agarosa) con 20 µl de cada mezcla, sobre una superficie plana y se dejaron solidificar. Luego, los “plugs” fueron incubados en buffer EC-Lisis (ANEXO 1 inciso 1.4, 3) a 37°C durante 5 hs y posteriormente 18 hs a 50°C en Buffer ES-P (ANEXO 1 inciso 1.4, 4) en baño de agua, para lisar las bacterias y dejar expuesto el ADN genómico para su digestión. Con la finalidad de eliminar los restos de las soluciones de lisis, los bloques de agarosa se lavaron 6 veces durante 30 min con Buffer TE pH; 8 (ANEXO 1 inciso 1.4, 5).

2-Digestión del ADN

Los "plugs" se incubaron en 500 µl de buffer Pre-SmaI con β-mercaptoetanol durante 1 h a 25°C. Se retiró el buffer y se agregaron 45 µl de Buffer Pre-SmaI (ANEXO 1) y 15 U de SmaI (Promega, EE.UU). Se incubaron a 25°C en baño de agua durante 17 hs.

3-Electroforesis de los fragmentos de restricción

Se preparó un gel de agarosa Pulsed Field Certified™ (BioRad, Laboratories Inc., Richmond, CA, EE.UU) al 1% en buffer TBE 0,5X (ANEXO 1 inciso 1.4, 8). En cada uno de los pocillos se colocaron los "plugs" digeridos. Los fragmentos de ADN fueron separados con un equipo CHEF DRIII System (Bio Rad, Laboratories Inc., Richmond, CA, EE.UU). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: distribución lineal de pulsos de 5 a 35 segundos, a 6 V/cm durante 23 hs. Como marcador de peso molecular, se utilizó el Lambda Ladder PFG, que contiene fragmentos de 50 Kbp a 1 Kpb (New England Biolabs, Beverly, MA, EE.UU). Finalmente los geles fueron teñidos con 0,5 mg/l de BrEt, el ADN, visualizados con un transiluminador de luz UV λ 255 nm (Fotodyne N3/3002) y el registro digital se realizó utilizando Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Sistem (BioRad, Laboratories Inc., Richmond, CA, EE.UU)

II.3.6.2 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD: random amplified polymorphic DNA)

Se realizó la técnica descrita por Wieliczko y col. (Wieliczko y col., 2002). La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, utilizando el equipo Veriti (Applied Biosystems, EE.UU) bajo las siguientes condiciones de trabajo:

Mezcla de reacción		Programa de amplificación	
Reactivo	Concentración Final	Desnaturalización del ADN 5 min a 94°C	
dNTPs	0,25 mM c/u	45 ciclos de reacción	
MgCl ₂	2,5 mM	Desnaturalización del ADN	30 seg a 94°C
Ope-4	0,56 µM	Hibridación de los oligonucleótidos	30 seg a 33°C
Buffer 5X	1X	Síntesis de ADN	2 min a 72°C
GoTaq Promega	3 U	Elongación de cadenas 10 min a 72°C	
ADN (ng)	250		

II.3.6.3 Análisis de los patrones de bandas obtenidos

Para establecer la relación clonal entre los diferentes aislados, a partir de los perfiles de bandas o fragmentos generados por ambas técnicas (PFGE o RAPD), se utilizó el programa informático BioNumerics versión 7.1 (Applied Maths, Sint- Martens-Latem, Bélgica). Las bandas fueron asignadas manualmente. Se utilizó el coeficiente de homología de Dice para comparar los patrones obtenidos. Para la visualización de la relación existente entre los aislados se construyó un dendrograma empleando el método de los promedios aritméticos no ponderados (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages) utilizando parámetros de optimización y de tolerancia en la posición de las bandas de 1 % y 1,5 %, respectivamente. Teniendo en cuenta los criterios de análisis descritos por Tenover y col. (Tenover y col., 1995), los aislados que presentaron más de 3 diferencias en los fragmentos de ADN y una similitud <80% en el análisis del dendrograma se clasificaron como diferentes tipos clonales, mientras que, aquellos que mostraron variaciones de fragmentos con una similitud >80% en el análisis del dendrograma se definieron como subtipos clonales. Los aislados que mostraron patrones idénticos (índice de similitud del 100%) se interpretaron también como pertenecientes al mismo tipo clonal (Abureema y col., 2014).

II.3.6.4 Cálculo del índice de diversidad de Simpson, coeficientes de Wallace y concordancia.

Índice de diversidad de Simpson (D): permite medir el poder discriminatorio de los sistemas de tipificación (Figura 1). Este índice indica la probabilidad de que 2 cepas al azar dentro de una población pertenezcan a 2 tipos clonales diferentes (Carrico y col., 2006).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

$$\sigma^2 = \frac{4}{N} \left[\sum \pi_j^3 - (\sum \pi_j^2)^2 \right]$$

$$CI = [D - 2\sqrt{\sigma^2}, D + 2\sqrt{\sigma^2}]$$

Figura.1. D: Índice de Simpson, CI: intervalo de confianza. N es el número total de cepas en la muestra poblacional, S es el número total de tipos descriptos, n_j es el número de cepas en cada tipo, y π_j es la frecuencia de n_j/N , σ : representa la desviación estándar.

Coefficiente de comparación de clusters (coeficiente de Wallace): brinda una evaluación cuantitativa de la congruencia de las clasificaciones de los diferentes agrupamientos obtenidas mediante dos metodologías. Permite conocer si los diferentes métodos identificaron la misma relación entre las cepas. En este estudio se compararon los resultados de PFGE y RAPD.

Ambos índices se calcularon utilizando el software EpiCompare versión 1.0 (<http://www3.ridom.de/epicompare/>).

La **concordancia** de cada par de aislados fue evaluada como se describió previamente (Robinson y col., 1998). Brevemente, todos los posibles pares de aislamientos fueron evaluados mediante la clasificación cruzada sobre la base de tipos clonales coincidentes o no coincidentes. La tabla 2x2 resultante se evaluó mediante el estadístico de chi-cuadrado, y el porcentaje de cepas concordantes se calculó utilizando el programa GraphPad InStat (GraphPad-InStat Software Inc., San Diego).

II.3.7 Amplificación de genes codificantes para dos factores de virulencia de *S. uberis*: pauA y sua.

Todas las reacciones se realizaron con 150 ng del ADN cromosomal, en un volumen final de 50 μ l en un termociclador Ivema T-18 (Ivema Desarrollos S.R.L., Argentina)

II.3.7.1 Amplificación del gen sua de *S. uberis*

El tamaño esperado del producto fue de 2732 pb y la PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción	
Reactivo	Concentración Final
dNTPs	0,3 mM c/u
MgCl ₂	1,5 mM
sua 5' / sua 3'	0,3 μM c/u
Buffer 5X	1X
GoTaq (Promega)	1 U
ADN (ng)	150

Programa de amplificación	
Desnaturalización del ADN 5 min a 94°C	
35 ciclos de reacción	
Desnaturalización del ADN	1 min a 94°C
Hibridación de los oligonucleótidos	1 min a 57°C
Síntesis de ADN	3 min a 68°C
Elongación de cadenas 10 min a 68°C	

II.3.7.2 Amplificación del gen pauA de *S. uberis*

El tamaño esperado del producto fue de 800 pb y la PCR se realizó en las siguientes condiciones de trabajo:

Mezcla de reacción	
Reactivo	Concentración Final
dNTPs	0,2 mM c/u
MgCl ₂	1,5 mM
pauA 5' / pauA 3'	0,8 μM c/u
Buffer 5X	1X
GoTaq (Promega)	1 U
ADN (ng)	150

Programa de amplificación	
Desnaturalización del ADN 2 min a 94°C	
30 ciclos de reacción	
Desnaturalización del ADN	1 min a 94°C
Hibridación de los oligonucleótidos	1 min a 49°C
Síntesis de ADN	1 min a 72°C
Elongación de cadenas 5 min a 72°C	

II.3.7.3 Purificación de los productos de PCR

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

II.3.7.4 Secuenciación

Las muestras de ADN (30-50 ng/μl) fueron secuenciadas por el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar en un secuenciador ABI3130xl (Applied Biosystems) con la química BigDye (Amersham, Bharmacia, Biotech,

Upsala, Suecia). El gen *pauA* se secuenció con los cebadores *pauA* 5' y *pauA* 3', mientras que el gen *sua* se secuenció utilizando los cebadores internos: *sua* 5', SUAM-2 5', SUAM-3 5', SUAM-4 5', *sua* 3' (Tabla 1).

II.3.7.5 Análisis de secuencias

Las secuencias consenso se obtuvieron utilizando el programa Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation). Luego, los archivos de estas secuencias se convirtieron a formato FASTA. Las secuencias se compararon con el único genoma de *S. uberis* disponible en el GenBank. Se estableció la homología a nivel de ADN y aminoácidos con las secuencias de los genes reportados utilizando el programa BLAST (Herramientas de Búsqueda de Alineamientos Locales, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) y el programa CodonCode Alligner (Code Corporation, Dedham, MA).

II.4 RESULTADOS

II.4.1 Aislamientos de *Streptococcus uberis*

Para llevar a cabo el estudio epidemiológico, se trabajó con aislamientos bacterianos obtenidos a partir de leche de animales con infección intramamaria de origen clínico y subclínico, de rebaños provenientes de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos (Figura 2). Se recibieron 175 aislamientos (Tabla 2) identificados como *S. uberis* mediante pruebas bioquímicas (ver inciso 2.1).

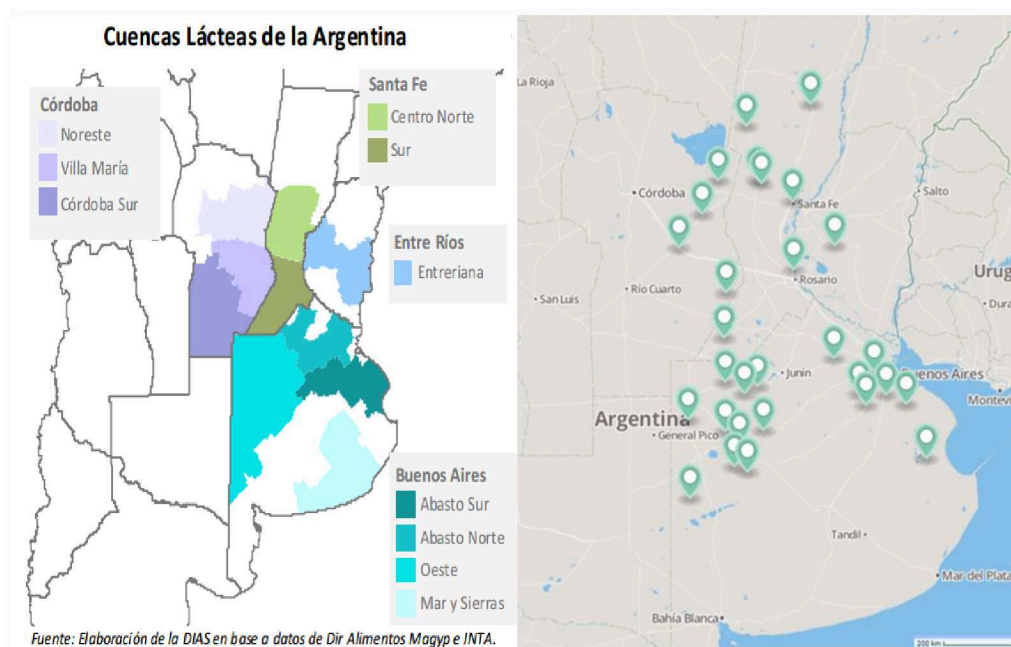


Figura.2. Distribución geográfica de los aislamientos de *S. uberis* identificados por pruebas bioquímicas clásicas. En la imagen de la izquierda se observa la distribución de las cuencas lecheras del país con sus principales regiones. Fuente: Dirección de Información y Análisis Sectorial en base de datos Dir. Alimentos MAGyP e INTA. En la imagen de la derecha se muestra con símbolos verdes las localidades de procedencia de los aislamientos estudiados en este trabajo.

Provincia	Aislamientos
Buenos Aires	142
Santa Fe	15
Entre Ríos	9
Córdoba	9
Total	175

Tabla 2: Distribución geográfica de los aislamientos de *Streptococcus uberis* identificados por pruebas bioquímicas

II.4.1.1 Identificación molecular de especie

Con el propósito de confirmar molecularmente la caracterización bioquímica se realizó el análisis de RFLP (Jayarao y col., 1992). La confirmación molecular es de importancia ya que hasta la fecha no se encontró una técnica bioquímica específica que permita diferenciar las especies *S. uberis* de *S. parauberis* (Facklam 2002).

Mediante esta técnica se confirmaron molecularmente como *S. uberis*, 154 aislamientos, del total de 175 muestras analizadas (Figura 3).

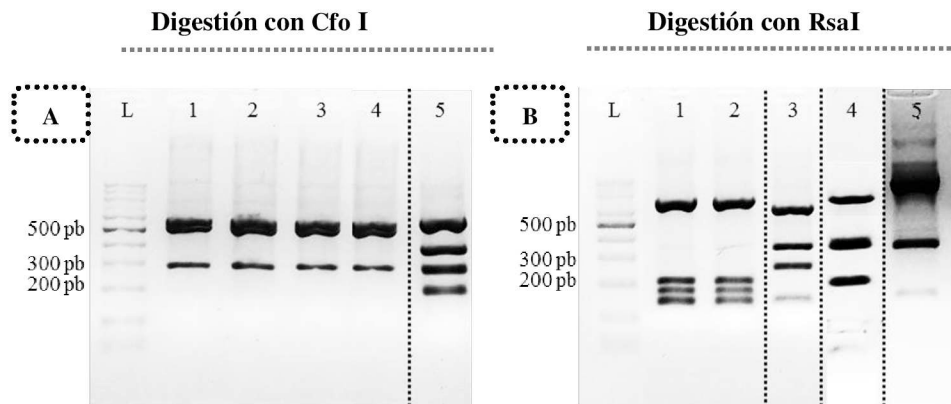


Figura.3. Productos de digestión de fragmentos amplificados del gen 16S de ARNr .

A: Digestión con CfoI: calles 1, 2, 3 y 4, perfil grupo A, calle 5, perfil grupo B. **B:** Digestión con RsaI: calles 1 y 2 perfil de *S. uberis*, calles 3 perfil de *S. agalactiae* o *S. dysgalactiae*, calle 4 *S. parauberis*. A la izquierda de cada figura, el marcador de peso molecular 100pb (L), Productos Biológicos®. Los pares de muestras con la misma enumeración en la imagen A y B, derivan de un mismo aislamiento.

II.4.2 Tipificación molecular de aislamientos

Las técnicas de tipificación molecular son una herramienta para la caracterización epidemiológica de patógenos bacterianos que permiten determinar la relación clonal entre aislamientos. Se realizaron dos técnicas de tipificación molecular: PFGE y RAPD-PCR, sobre los 154 aislamientos confirmados molecularmente como *S. uberis*

II.4.2.1 PFGE

La técnica consistió en una macrodigestión del ADN cromosomal del microorganismo con la enzima de restricción SmaI. De dicha macrodigestión se obtuvieron entre 1 y 23 fragmentos de un tamaño entre 48,5 Kb y 436,5 Kb (ANEXO 2, 1.2 Figura 1). Si bien se realizaron corridas electroforéticas de 154 aislamientos, el análisis de datos se realizó sobre 137, dado que se seleccionaron aquellos aislamientos de los cuales se contaba con información del campo y la localidad de origen.

El análisis de los 137 aislamientos (provenientes de 122 animales y correspondientes a 35 campos) reveló 61 tipos de patrones de PFGE (PF), 29 compuestos por aislados únicos, y 32 conteniendo entre 2 a 8 aislamientos por tipo. La distribución de aislamientos entre los grupos de PFGE fue: 19 tipos con 2 aislados (PF04, 09, 11, 12, 15, 16, 18, 21, 23, 25, 27, 37, 43, 45, 46, 47, 55, 56 y 57), 5 tipos con 3 aislados (PF 13, 19, 32, 33, y 40), 5 tipos con 4 aislados (PF 20, 31, 34, 35 y 39), 2 tipos con 6 aislados (PF14 y PF29) y 1 tipo con 8 aislados (PF01) (ANEXO 2, 1.2 Figura 1).

No se observó ninguna relación entre los tipos obtenidos por PFGE y el tipo de mastitis (clínica o subclínica). Sin embargo, dentro de los grupos clonales con una similitud mayor al 80%, se encontraban aislados procedentes de diferentes campos. Asimismo, se observaron patrones similares (similitud mayor al 80%) entre aislados de un mismo establecimiento, en 11 tipos (PF 1, 4, 14, 19, 20, 29, 31, 32, 34, 35 y 47).

En 15 de los 137 aislados analizados, se obtuvieron patrones de PFGE de baja calidad, por lo que no pudieron ser asignados a un grupo y fueron clasificados como no tipificables. Teniendo en cuenta estos datos, la capacidad de tipificación de esta técnica fue de un 90,5% de acuerdo al análisis realizado con el programa EpiCompare.

4.2.2 RAPD-PCR

El análisis se realizó sobre 137 aislados sobre la base de los mismos criterios mencionados en el inciso 4.2.1. Esta técnica de tipificación se basa en la amplificación de regiones aleatorias del genoma, utilizando una secuencia arbitraria de ADN (Williams y col., 1990). De dicha amplificación se obtuvieron productos que oscilaron entre 0,5 y 8,0 kb de tamaño. Las diferencias entre las cepas fueron dadas por productos de tamaños entre 1632 y 1800 pb (datos no mostrados). Sobre los 137 aislamientos analizados se identificaron 25 patrones clonales de RAPD-PCR (RD). Cinco de ellos incluyeron un solo aislamiento y 20, contenían entre 2 y 17 cepas. La composición de los grupos fue la siguiente: 4 tipos con 2 aislados (RD07, 12, 20 y 22), 3 tipos con 3 aislados (RD05, 08 y 15), 1 tipo con 4 aislados (RD19), 5 tipos con 5 aislados (RD04, 11, 16, 18 y 23), 1 tipo con 7 aislados (RD14), 2 tipos con 8 aislados (RD01 y 06), 1 tipo con 9 aislados (RD03), 1 tipo con 11 aislados (RD09), 1 tipo con 13 aislados (RD13), y 1 tipo con 17 aislados (RD10) (ANEXO 2, 1.2 Figura 1). En todos los aislamientos se observó un patrón de productos de amplificación conservados, con los siguientes tamaños: 1632 pb, 1800 pb y 2430 pb.

Al igual que para PFGE, no se encontró asociación entre el perfil de bandas, el tipo de mastitis y el establecimiento de origen. Trece aislados no pudieron ser asignados a un grupo clonal dada la baja calidad observada en su patrón de electroforesis y se clasificaron como no tipificables. En consecuencia, la capacidad de tipificación de la RAPD-PCR fue de un 89% de acuerdo al análisis realizado con el programa EpiCompare.

Con ambas metodologías, se analizaron los aislamientos provenientes de un mismo animal. En cuatro animales con dos aislamientos cada uno, de diferentes fechas de toma de muestras, se observó una identidad menor al 80%. Esto sugiere que no se trata de un tipo de mastitis recurrente, sino de una segunda infección con una cepa ambiental diferente. En un animal se obtuvieron 4 aislamientos, dos en una misma fecha y de cuartos mamarios diferentes (SU139 y SU140), y dos de dos tomas de muestras en tiempos diferentes (SU161 y SU87), entre ellas y a las anteriores. Entre estos 4 aislamientos se reveló identidad genética mediante análisis de PFGE entre SU139 y SU161 y por RAPD-PCR entre SU161

y SU140. Esto sería indicio de una infección repetitiva o de una infección crónica, aunque esto sólo fue observado en un animal.

4.2.4 Comparación de los métodos de tipificación

Para comparar el poder discriminatorio de PFGE y RAPD-PCR, se determinó el número medio de aislamientos por tipo de PFGE o RAPD-PCR y el índice de diversidad de Simpson (Tabla 8).

El índice de diversidad de Simpson para el método de PFGE 0,983 (IC del 95%: 0,978-0,989) es mayor al índice de 0,941 (IC del 95%: 0,927-0,955) obtenido para el método de RAPD-PCR.. Con el propósito de comparar la congruencia entre las asignaciones de tipos clonales utilizando PFGE y RAPD-PCR, se calcularon los coeficientes de Wallace (W). Los valores de W indican la probabilidad de que dos aislamientos agrupados en el mismo tipo con un método, sean agrupados en un mismo tipo con otro método. Los valores de W obtenidos para PFGE y RAPD-PCR fueron de 0,042 a 0,172 (W = 1 indica 100% de congruencia) indicando una congruencia bidireccional débil entre los tipos generados por ambos métodos. Aunque la correlación entre la tipificación por PFGE y RAPD-PCR fue pobre, se encontró una notable concordancia cuando se analizó la relación entre cada par de aislamientos (Tabla 9). La clasificación cruzada de los aislamientos, basada en pares coincidentes o no coincidentes para PFGE y RAPD, mostró que los dos sistemas de tipificación poseen un 92,6% de concordancia. Los resultados indican que cualquier par de aislamientos diferenciados por una metodología tiende a ser diferenciado por la otra también

agrupados Método	N° de tipo	N° de aislados por tipo (media ± DE)	Índice de Simpson (95% IC)
PFGE	61	2±1,4	0,983 (0,978-0,989)
RAPD-PCR	25	5±4,1	0,941 (0,927-0,955)

Tabla.8. Índice de diversidad de Simpson de los métodos de genotipificación para todos los tipos de aislados.

		RAPD-PCR	
		Concordancia	No concordancia
PFGE	Concordancia	16	77
	No concordancia	369	5533

Tabla.9. Clasificación cruzada de todos los posibles pares de aislamientos basados en coincidencia o no coincidencia de tipos de PFGE y RAPD. Concordancia 92,6%. $P < 0,001$ prueba de Chi-cuadrado.

II.4.3 Estudio genético de factores de virulencia

II.4.3.1 Prevalencia de genes pauA y sua

El activador del plasminógeno A (PauA), codificado por el gen pauA, y la molécula de adhesión de *S. uberis* (SUAM), codificada por el gen sua, han sido descritos como dos de los principales factores de virulencia de *S. uberis*. Por tal motivo, se evaluó mediante PCR, la prevalencia de los genes pauA y sua sobre el total de aislamientos de *S. uberis* identificados molecularmente en este trabajo ($n=154$). Los productos amplificados generaron fragmentos de 800 pb, para pauA, (Figura 4, A) y de 2971 pb, para sua (Figura 4, B). Se observó que el 97,40 % ($n= 150$) de los aislamientos amplificó el gen pauA y 98,05 % ($n=151$) el gen sua. Solamente en dos aislamientos no pudo evidenciarse ninguno de los dos genes (SU104 y SU106). El detalle de los resultados obtenidos para cada aislamiento se resume en la Tabla 2 del ANEXO 2.

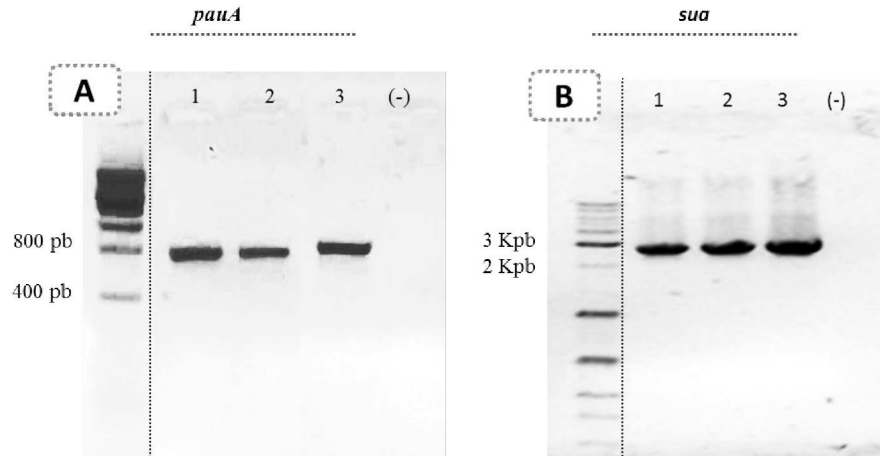


Figura.4. PCR de los genes pauA y sua de *S. uberis*. A: Calles 1, 2 y 3 muestran la presencia del gen pauA (800 pb). B: Calles 1, 2 y 3 muestran la presencia del gen sua (2971pb). (-) control blanco de reacción. A la izquierda de cada figura: marcador de tamaño molecular de 100 pb, Productos Biológicos® (A) y de 1Kb Axigen (B).

II.4.3.2 Polimorfismo de secuencias de factores de virulencia

El análisis de secuencias nucleotídicas es una herramienta que nos brinda información a nivel genómico de los microorganismos. Con el objeto de estudiar el polimorfismo de los genes codificantes para PauA y SUAM, se secuenciaron los productos obtenidos por PCR de 20 aislamientos seleccionados del total de *S. uberis* estudiados en este trabajo (ANEXO 2, Tabla 2). Para esta selección se tuvo en cuenta que los aislamientos no estén relacionados epidemiológicamente y que estén distribuidos geográficamente a lo largo de la cuenca lechera Argentina (Figura 5).



Figura .5. Mapa de la distribución del origen de los aislamientos. En rojo se indica el origen de los aislamientos seleccionados para la secuenciación de los genes codificantes de factores de virulencia.

Las secuencias nucleotídicas del gen *sua* mostraron una identidad del 99% con respecto a la única secuencia de referencia de Genbank (DQ232760.1) (Almeida y col., 2006a). En concordancia con la identidad de secuencias nucleotídicas, las secuencias aminoacídicas de los aislados mostraron entre un 97 a 99% de identidad respecto a la secuencia de referencia (GenBank ABB52003.1) (Almeida y col., 2006a). Para el gen *pauA*, las secuencias nucleotídicas mostraron una identidad entre un 95% y el 100% respecto a las 55 secuencias registradas en GenBank (ANEXO 2, inciso 1.4 y 1.5). Del mismo modo, las secuencias de aminoácidos mostraron entre un 96 a 100% de identidad respecto a secuencias de referencia.

II.4 DISCUSIÓN

El poco control de las IIM causadas por *S. uberis* hasta hoy en día se atribuye, en parte, a la diversidad clonal de cepas en una determinada área geográfica y la heterogénea distribución de los factores de virulencia. A partir de esta situación, en este estudio se pretendió explorar la distribución clonal de *S. uberis* mediante dos metodologías. Asimismo, con la finalidad de encontrar candidatos vacunales apropiados, se estudió la prevalencia y conservación de dos factores de virulencia, sobre aislados de Argentina.

En este estudio se demostró una distribución clonal heterogénea. Entre los 137 aislamientos analizados, se diferenciaron 61 patrones clonales de PFGE. Estos resultados están en línea con un trabajo de tipificación de *S. uberis* realizado previamente en la Argentina en el cual se identificaron 18 tipos de PFGE entre 32 aislamientos de mastitis subclínica (Lasagno y col., 2011). De la misma manera, estudios llevados a cabo en diferentes áreas geográficas del mundo, reportaron la existencia de una elevada variabilidad genética en aislados de *S. uberis* mediante PFGE (Rato y col., 2008a, Wang y col., 2013, Abureema y col., 2014). Los resultados de este trabajo demostraron que no existiría una asociación entre el patrón de PFGE o RAPD-PCR y el tipo de mastitis en coincidencia con lo observado en otros estudios (Jayarao y col., 1991, Jayarao y col., 1992, Jayarao y col., 1993). La causa que provoca uno u otro tipo de mastitis, sigue siendo un terreno a explorar, y estaría relacionada con la virulencia de las cepas, la genética del animal y las condiciones de crianza (Hill 1988). Por otro lado, se observaron once tipos de PFGE entre 26 aislamientos provenientes de diferentes animales pertenecientes a un mismo establecimiento y resultó así similar a lo reportado por Douglas y col. en campos de Nueva Zelanda (Douglas y col., 2000). Esto indicaría que, en algunos casos, los animales podrían ser infectados a partir de una fuente común o por la propagación de una vaca a otra, debido, en parte, a la incorrecta higiene durante la manipulación en el ordeño. Este factor debe ser considerado para la implementación de programas de control de mastitis, ya que se encuentra asociado a infecciones, particularmente donde la crianza en espacios reducidos es frecuente. Por otro lado, se observó en muchos casos tipos de PFGE estrechamente

relacionados entre aislamientos de diferentes campos en coincidencia con aquellos informados en otros estudios (Douglas y col., 2000, Lasagno y col., 2011). Si bien las razones de estos resultados no son claras, es posible que aquellas cepas aisladas entre diferentes establecimientos, fueran más prevalentes en el medio ambiente.

La tipificación por RAPD-PCR se basa en la amplificación de sitios diana arbitrarios bajo condiciones de reacción poco astringentes (Olive y col., 1999) resultando en una baja reproducibilidad de la técnica (Gallego y col., 1997). En este trabajo se optimizaron las condiciones de reacción con el objeto de minimizar la variabilidad. Entre ellas se optimizó la temperatura de annealing, se utilizó un mismo lote de Taq polimerasa y se realizaron las reacciones en placas de 96 pocillos. Los resultados obtenidos por RAPD-PCR permitieron diferenciar 25 tipos clonales sobre un total de 137 aislados. Los fragmentos amplificados conservados entre los aislados se diferencian con los descriptos previamente en estudios de Nueva Zelanda y Estados Unidos (Gillespie y col., 1998, Gillespie Be 1998, Wieliczko y col., 2002). Esta discrepancia pone de manifiesto que la técnica de RAPD-PCR no permitiría comparar resultados provenientes de diferentes áreas geográficas. Sin embargo, la técnica permite realizar un estudio epidemiológico en menor tiempo, con menos equipamiento y con un bajo costo (Wieliczko y col., 2002).

El poder discriminatorio y la congruencia entre los métodos fueron comparados mediante el índice de diversidad de Simpson y los coeficientes de Wallace. En este trabajo el análisis estadístico mostró, que ambos métodos de tipificación presentan un alto poder discriminatorio, como indica el índice de diversidad de Simpson (PFGE; 0,983 y RAPD-PCR; 0,941). Se definió una débil congruencia entre los tipos clonales definidos por PFGE y RAPD-PCR, reflejado en el coeficiente de Wallace (0,042 y 0,172). Así, se pone en evidencia que los agrupamientos clonales obtenidos por cada técnica difícilmente coincidan. Tal como se observa en el análisis comparativo de los resultados obtenidos con ambas metodologías (RAPD-PCR y PFGE), los aislamientos que pertenecen a un mismo tipo de RAPD mostraron diferentes tipos de PFGE y viceversa. Sin embargo, el análisis de concordancia resultó en un valor de 92,6% indicando que cada par de aislamientos puede ser discriminado tanto por PFGE como por RAPD-PCR. Hasta la fecha, este es el primer

estudio que informa un análisis estadístico de estas dos técnicas aplicadas a la epidemiología de *S. uberis*.

La técnica de PFGE es considerada una técnica de elección para epidemiología de corto plazo o local (Coffey y col., 2006), ya que cambios genéticos mínimos pueden dar lugar a una diferencia de tres fragmentos en el patrón de bandas de PFGE (Stratton 2006, Li y col., 2009). Por otra parte, varios estudios han demostrado que la técnica de PFGE tiene mayor poder discriminatorio que la tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Van Belkum y col., 2007, Rato y col., 2008b, Vimont y col., 2008). La menor heterogeneidad de cepas definidas por RAPD-PCR, podría deberse a la incapacidad del sistema de tipificación para discriminar entre cepas estrechamente relacionadas (Gillespie y col., 2004).

Entre los aislamientos analizados, se encontraron cepas no tipificables (NT) mediante las dos metodologías empleadas. Estos casos, en RAPD-PCR representaron un 11% (15/137) y un 9% (12/137) para PFGE. Datos similares fueron reportados previamente y los autores propusieron que se debería a un bajo rendimiento en la extracción de ADN, particularmente en cepas capaces de expresar cápsula de ácido hialurónico (Gillespie y col., 2004). Sin embargo, en este trabajo no está claro el motivo de estos resultados, dado que no se evidenciaron inconvenientes en las amplificaciones realizadas utilizando como molde el mismo ADN. Por otra parte, en nuestro trabajo, aquellas cepas que resultaron NT por una técnica, pudieron ser tipificadas por la otra. Esto nos permite proponer el uso complementario de ambas metodologías para un estudio epidemiológico.

La marcada diversidad genética de *S. uberis* indica que la virulencia no está asociada a un tipo molecular particular. Se ha sugerido, además, que la diversidad clonal de *S. uberis* es un obstáculo para el desarrollo de una vacuna eficaz dado que no se ha logrado protección frente cepas heterólogas en vacunas vivas experimentales (Finch y col., 1997). Sin embargo, la diversidad clonal de *S. uberis* no necesariamente se encuentra relacionada con variación en la secuencia de algunos genes de importancia. Esto se ha visto reflejado en trabajos previos donde se observó que, tipos de PFGE con menos de 80% de similitud

conservaban el mismo tipo de secuencia (ST) en genes utilizados para el análisis por MLST (Rato y col., 2008b).

A pesar del impacto económico causado por esta infección, los factores de virulencia asociados con la patogenia de *S. uberis* no son bien conocidos (Almeida y col., 2006a). Más aún es difícil identificar moléculas antigénicas conservadas en *S. uberis*, basándose en el alto nivel de la variabilidad genética entre diferentes cepas (Pullinger y col., 2006). Sin embargo, dos de los factores de virulencia de *S. uberis* evidenciaron participar en el establecimiento de la infección. El activador de plasminógeno (PauA) se ha propuesto como intermediario importante para obtener los nutrientes para el crecimiento óptimo del microorganismo (Oliver y col., 1998, Ward y col., 2004b). Por otra parte, el éxito de la infección intramamaria depende de la adherencia, la internalización, y la persistencia intracelular (Oliver y col., 1998, Patel y col., 2009). La molécula de adhesión de *S. uberis* (SUAM) juega un papel central en la adherencia de *S. uberis* a células epiteliales mamarias bovinas (Fang y col., 2000) contribuyendo a la persistencia de la infección. En el presente trabajo, se detectó la presencia del gen *pauA* en el 97,4% de los 154 aislamientos estudiados. Si bien estos resultados difieren con lo reportado previamente en Argentina, donde el 61,5% de los aislamientos estudiados portaba el gen *pauA* (Reinoso y col., 2011), coinciden con lo observado en diferentes lugares del mundo, donde la prevalencia del gen *pauA* fue mayor al 96% (Khan y col., 2003, Leigh y col., 2004, Shome 2012). El estudio de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *PauA* en 20 aislamientos, reveló una identidad mayor al 95% con respecto a las 55 secuencias registradas en GenBank, lo cual indica que *pauA* es un gen altamente conservado, además de estar presente en la mayoría de los aislados.

En este trabajo la prevalencia del gen *sua* fue de 98,05% de 154 aislados. Estos resultados se encuentran en línea con lo reportado en estudios de aislados de Argentina, Estados Unidos, Inglaterra, Nueva Zelanda e India, en los cuales se observó el gen en un porcentaje mayor al 83% de los aislados (Luther y col., 2008, Reinoso y col., 2011, Shome 2012, Yuan y col., 2014). Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *sua* analizadas sobre 20 aislamientos mostraron una identidad mayor al 97% con respecto a la secuencia de

referencia (ABB52003.1) en coincidencia con los resultados reportados en un trabajo reciente donde se analizaron muestras provenientes de Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia (Yuan y col., 2014). La alta identidad del gen *sua* entre aislamientos de *S. uberis* provenientes de diversas áreas geográficas del mundo sugiere que SUAM puede participar en uno de los mecanismos de adaptación utilizados por *S. uberis* para infectar y persistir en la glándula mamaria bovina. En comparación con estudios previos, la importancia de este trabajo radica en el elevado número y la amplia distribución de los aislados analizados, provenientes de mastitis clínica y subclínica y obtenidos en un período de dos años. En conjunto, estos resultados demuestran la elevada prevalencia de los genes *sua* y *pauA* en aislamientos de Argentina. Además, se pudo demostrar que, a pesar de su gran diversidad genética, estos genes poseen secuencias conservadas, dado que se encontró una alta similitud de secuencias con las provenientes de diferentes áreas geográficas del mundo. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que compara los aislamientos de campo frente a secuencias informadas del GenBank de diferentes países.

El diseño de una vacuna debe apuntar a que la misma sea eficaz contra una multitud de cepas. En este sentido, la eficacia puede verse reducida si los inmunógenos no se seleccionan apropiadamente. Por lo tanto, la capacidad de controlar estas infecciones mediante la inmunización depende de un conocimiento profundo de la epidemiología y la patogénesis del microorganismo.

II.5 CONCLUSIONES PARCIALES

Se observó una gran variabilidad clonal entre los aislamientos analizados por PFGE y RAPD-PCR. Se determinó estadísticamente que ambas metodologías mostraron un buen poder discriminatorio. A pesar de estimarse una congruencia bidireccional débil entre los tipos generados por ambos métodos, se encontró una notable concordancia cuando se analizó la relación entre cada par de aislamientos.

Se observó que la secuencia de algunos genes puede estar conservada. La alta prevalencia y conservación de pauA y sua a pesar de la variabilidad genética reportada, permitiría proponer a ambos factores de virulencia como candidatos a inmunógenos.

Capítulo III: Estudio preliminar de antígenos y funcionalidad de anticuerpos en modelo murino

III.1 MARCO TEÓRICO

S. uberis, hasta la fecha es un microorganismo que aún no es controlado por inmunoprofilaxis. Esto se debe en parte a la variabilidad genética que posee. Otro de los factores que contribuyen a la falta de un inmunógeno eficaz para su control, es el poco conocimiento de los factores de virulencia y su influencia en la patogénesis del microorganismo. La virulencia de *S. uberis* se asocia a la expresión de diferentes genes, así como a la capacidad de resistir la fagocitosis conferida por la cápsula de ácido hialurónico (Ward y col., 2001). Otros factores como los activadores de plasminógeno, PauA (Rosey y col., 1999) y PauB (Ward y col., 2002), se encuentran implicados en la colonización de la glándula mamaria. *S. uberis* posee proteínas de superficie con capacidad de unión a lactoferrina bovina (LFb) conocidas como proteínas de unión a LFb (LPB por sus siglas en inglés Lfb-binding protein), la cual es considerada un mecanismo de anclaje a la célula huésped (Moshynskyy y col., 2003). Una proteína con capacidad de unión a LF que participa en la adherencia e invasión a las células epiteliales se describió como molécula de adhesión de *S. uberis* (SUAM) (Almeida y col., 2006a). El factor CAMP es considerado un potencial factor de virulencia debido a que posee propiedades de unión a Fc y acción co-hemolítica frente a eritrocitos pre-tratados con toxina β de *S. aureus* (Jurgens y col., 1987, Jiang y col., 1996). Las proteínas de superficie deshidrogenasa GapC (Perez-Casal y col., 2004) y Opp, están involucradas en el transporte de solutos esenciales para el crecimiento de *S. uberis* en la leche (Smith y col., 2002). MutA es una lipoproteína que le permite adquirir manganeso, mecanismo asociado al transportador ABC esencial para el crecimiento in vivo de *S. uberis* (Smith y col., 2003). Por último, uno de los factores recientemente hallados es una proteína denominada sortasa A (SrtA), la cual se utiliza como anclaje de otras proteínas requeridas para la colonización e inducción de una respuesta inflamatoria severa (Leigh y col., 2010). Entre los factores conocidos de *S. uberis*, nos centraremos en el activador de plasminógeno (PauA) y la molécula de adhesión de *Streptococcus uberis* (SUAM), dos factores que participan en el inicio de la infección.

Desde 1981 se tiene conocimiento que la adhesión a las células epiteliales o proteínas de la matriz extracelular constituye un paso temprano y crucial en el proceso de infección

(Beachey 1981). La adherencia de la bacteria virulenta a receptores específicos sobre la superficie mucosa del huésped es un mecanismo utilizado para colonizar la glándula y resistir la salida durante el ordeño (Hasty y col., 1992, Lammers y col., 1999). La adherencia a células epiteliales mamarias fue observada en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalacteae* y *Staphylococcus coagulasa* negativos (Mamo y col., 1988, Filippsen y col., 1990, Molinari y col., 2000). Al igual que en estos microorganismos, se observó que *S. uberis* se adhiere a las células mamarias (Almeida y col., 1996). En un primer momento se pensó que la adherencia de *S. uberis* era mediado por LBP, pero un estudio mutacional demostró que la LBP no participa de la adherencia del microorganismo hacia las células mamarias (Moshynskyy y col., 2003). Más aún, el análisis de secuencia demostró que no hay similitud entre la LBP y SUAM, de este modo se demostró que SUAM era una proteína no descrita, con capacidad de unión a LFb. Hoy en día se conoce que la adherencia es llevada a cabo por SUAM (Almeida y col., 2006a), mediante unión a la lactoferrina (LF) (Fang y col., 2000) (Figura 1). La LF se encuentra presente en la leche de bovinos en altas cantidades. Si bien posee función como antimicrobiano hacia varios microorganismos, no lo es hacia *S. uberis*, debido a que éste no posee altos requerimientos de hierro (Fang y col., 1999). El mecanismo dilucidado hasta hoy establece que la LF hace de puente molecular entre la bacteria y un receptor de LF constitutivo ubicado sobre la superficie de células epiteliales mamarias. De este modo permite el ingreso a la célula mamaria evadiendo el sistema inmunológico, por enmascaramiento de los epítopes (Patel y col., 2009). Este mecanismo fue observado previamente en otras especies del género *Streptococcus* (Molinari y col., 2000).

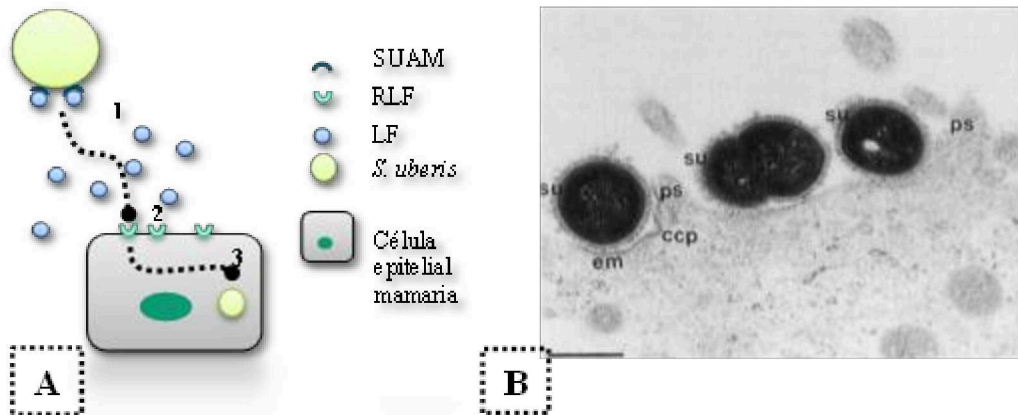


Figura.1. A: Mecanismo de adherencia e invasión de *S. uberis* a través de la Lactoferrina (LF) a células epiteliales mamarias. **1.** Unión de la LF a la molécula de adhesión de *S. uberis* (SUAM), **2.** Unión de LF a su receptor constitutivo en célula epitelial mamaria (RLF), **3.** Ingreso a la célula epitelial. **B:** Microscopía electrónica de *S. uberis* (su) adherida a células epiteliales MAC-T, mesosoma cubierto de clatrina (ccp), material electro-denso (em) y estructuras tipo pseudópodos (ps), barra = 1 μm . Fuente: (Almeida y col., 1996).

Mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión se demostró que *S. uberis* induce cambios en la membrana de la célula huésped, los cuales incluyen pseudópodos y formación de vacuolas en las que *S. uberis* se interioriza a la célula huésped (Matthews y col., 1994). Sin embargo, luego de 24 hs de la internalización, *S. uberis* ya no se observa contenido en las vacuolas, sino libre en el citosol de las células huésped. La adherencia e internalización de *S. uberis* a células epiteliales genera un reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped y expresión de proteínas de novo (Gilbert y col., 1997, Almeida y col., 2001). Una investigación adicional demostró que *S. uberis* aprovecha las proteínas quinasas de las células huésped para inducir su propia señal de "endocitosis" por las células epiteliales (Almeida y col., 2006b). El ingreso de *S. uberis* a las células se realiza mediante endocitosis dependiente de caveolas, varios antecedentes indican que este mecanismo es una estrategia que permite el ingreso del patógeno sin enfrentarse a mecanismos microbicidas intracelulares, ya que evade la acidificación de endosomas y la fusión a lisosomas (Almeida y col., 2006b). Los resultados obtenidos a través de un estudio mutacional sobre *S. uberis*, mostraron que en ausencia de la expresión de SUAM en presencia o ausencia de LF, la adhesión y la internalización de *S. uberis* en células MAC-T era reducida notablemente en comparación con la cepa *S. uberis* no mutada (Chen y col., 2011). Estos resultados confirmaron el papel de virulencia de SUAM como una adhesina/invasina. Además definen el papel de SUAM como ligando de LF y su efecto potenciador sobre la adhesión y la internalización de *S. uberis* en células epiteliales mamarias bovinas.

Los resultados sugieren que la adhesión y la subsiguiente internalización de patógenos de mastitis en células epiteliales mamarias es un importante evento temprano en el establecimiento de IMI en las vacas lecheras.

Mediante una infección inducida experimentalmente se demostró que *S. uberis* se localiza predominantemente en el área luminal de los alvéolos secretorios y el tejido ductal (Thomas y col., 1994), indicando que gran parte del crecimiento bacteriano se produce en leche residual o recientemente sintetizada. Es probable que este entorno sea deficiente en péptidos y aminoácidos libres. Debido a que *S. uberis*, al igual que otros miembros del género *Streptococcus*, son nutricionalmente exigentes y auxotróficos para varios aminoácidos (Ward y col., 2003), la etapa inicial de la infección está mediada por un activador de plasminógeno. Éste activa plasmina para degradar proteínas de la leche, aumentando la disponibilidad de péptidos y aminoácidos para la bacteria. Se ha planteado esta hipótesis de acuerdo a las observaciones previas en donde en ausencia de la proteólisis directa por la bacteria, la baja concentración de aminoácidos esenciales limita el crecimiento de las bacterias auxotróficas tales como *S. uberis* (Kitt y col., 1997). De acuerdo a estos conocimientos se propuso que el crecimiento de *S. uberis* en la leche puede depender de la activación del plasminógeno, lo que facilitaría la infección temprana de la glándula mamaria permitiendo su rápido crecimiento (Leigh 1993). Adicionalmente, se observaron niveles elevados de actividad del activador de plasminógeno asociados con recuentos elevados de células somáticas en leche aislada de cuartos con mastitis, demostrando que la actividad del activador de plasminógeno se incrementa durante la inflamación (Zachos y col., 1992). Otros efectos sobre el sistema biológico pueden estar asociados con la patogénesis de infección, incluyendo fibrinólisis, la degradación de las proteínas de matriz (Vassalli y col., 1991) y la activación de las metaloproteinasas (Goldberg y col., 1990).

La producción de plasmina a partir de plasminógeno es mediada por el factor de virulencia PauA, una molécula de peso molecular aproximado entre 29 y 33,4 KDa (Leigh 1994, Rosey y col., 1999). Estructuralmente, el activador de plasminógeno PauA, posee dos dominios (Johnsen y col., 1999). Para su funcionamiento son necesarias tanto las regiones

amino como carboxilo terminal de la proteína. Por otra parte, se ha demostrado que un dominio denominado alfa, contiene regiones que poseen un rol crítico en la unión al plasminógeno para formar un complejo activo (Ward y col., 2004a). Recientemente se determinó la importancia del gen regulador putativo independiente *vru*, para la virulencia de *S. uberis* mediante análisis diferencial de la transcripción por medio de microarrays. En ausencia de *vru*, se observó una expresión génica alterada en las secuencias codificantes de genes de virulencia conocidos y putativos. Entre ellos, *pauA*, *lbp*, *hasA* y *sclB*. (Egan y col., 2012).

Además de activar el plasminógeno bovino, el cual está disponible normalmente en la leche, *S. uberis* también es capaz de unir la proteasa plasmina activa sobre su superficie (Leigh y col., 1997). Este fenómeno habría sido descrito en otros microorganismos como es el caso de la estafiloquinasa de *Staphylococcus aureus* y las estreptoquinasas de *Streptococcus* de los grupos A, C y G de la clasificación de Lancefield. Se cree que la plasmina unida a la superficie bacteriana beneficia la producción de péptidos en la proximidad de la célula bacteriana, esto genera resistencia a los efectos inhibitorios de la α 2-anti plasmina (Lincoln y col., 1998). La adquisición de plasmina podría promover la invasión, si bien no hay evidencias de esto en el caso de *S. uberis*.

Ensayos de inmunización de bovinos con *PauA*, extraída de un cultivo de *S. uberis*, mostraron que los anticuerpos generados presentaban capacidad de neutralización y disminución de la colonización e incidencia de la infección, frente a desafíos con cepas homólogas y heterólogas de *S. uberis* (Finch y col., 1997). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la activación del plasminógeno por medio de *PauA* no juega un rol central en la capacidad del crecimiento de *S. uberis* y colonización en la glándula mamaria (Ward y col., 2003). En el estudio de Ward se realizaron ensayos de infección intramamaria utilizando una *PauA* truncada sin capacidad para producir plasmina. Se observó que la proteína truncada no perdió su capacidad de colonización reflejada en el elevado recuento de células somáticas obtenido. Esto indica que la forma truncada de *PauA* conserva algunas actividades de la molécula completa que son importantes para la

patogénesis y que estas actividades son suficientes para la virulencia e independientes de la producción de plasmina.

El rol preponderante de PauA en el establecimiento de las infecciones por *S. uberis* en la glándula mamaria sumado a la alta conservación y frecuencia que su gen codificante, *pauA*, posee entre aislamientos de *S. uberis* hacen de esta proteína un candidato vacunal atractivo.

III.2 OBJETIVO GENERAL

Centrar el estudio en particular en los dos factores de virulencia descritos, SUAM y PauA, para el diseño de una vacuna a subunidades posee la ventaja de abarcar dos mecanismos patogénicos del microorganismo. De este modo se pretende focalizar la respuesta en dos factores implicados en el inicio de la enfermedad como son la adherencia, que participa en la primera etapa, y la invasión celular, donde se produce la colonización de la glándula. Este capítulo se centrará en la obtención de ambos antígenos recombinantes y en el estudio funcional de los anticuerpos, generados mediante un modelo murino.

III.2.1 Objetivos específicos

- Evaluar regiones ricas en determinantes antigénicos de la proteína SUAM.
- Clonar regiones ricas en determinantes antigénicos o la secuencia codificante de la proteína entera.
- Evaluar las propiedades antigénicas e inmunogénicas de las proteínas recombinantes SUAM y PauA, mediante inmunización en ratones.
- Obtener las proteínas recombinantes SUAM y PauA wild type.
- Evaluar in vitro la funcionalidad de los anticuerpos generados.

III.3 MATERIALES Y MÉTODOS

III.3.1 Obtención de los antígenos recombinantes

III.3.1.1 Predicción de epítopes B

El estudio de predicción de epítopes sobre la secuencia codificante de SUAM se llevó a cabo utilizando dos programas informáticos, ABCpred y AAPPred. El primero (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), permite la predicción de epítopes B, de una longitud definida (10, 12, 14, 16 o 20 aa) y el análisis de antigenicidad está basado en una red neuronal artificial, sobre una base de datos de epítopes conocidos (Saha y col., 2006). En este trabajo se utilizó una longitud definida entre 10 y 20 aa. Por otro lado, el programa AAPPred (<http://www.bioinf.ru/aappred/>), determina la antigenicidad de pares de aminoácidos (AAP), evaluando la frecuencia con la que aparecen, junto a una escala de propensión de hidrofobicidad, flexibilidad, accesibilidad en una proteína y polaridad.

III.3.1.2 Obtención de los fragmentos codificantes de SUAM y PauA de *S. uberis*

III.3.1.2.1 Obtención de ADN genómico de *S. uberis*

Para la obtención de la secuencia codificante de la proteína de interés, es necesario disponer de ADN genómico preparado de la fuente de origen de la proteína en cuestión, utilizándolo como molde para una reacción de PCR (Turner y col., 2000). Por lo tanto, se extrajo ADN genómico de una cepa de *S. uberis* aislada de un caso de mastitis, previamente caracterizado (SU05) como se describió en el capítulo II. Se realizó la técnica descrita por Hill y Leigh (Hill y col., 1989), detallada en capítulo II inciso 3.2.

III.3.1.2.2 Cebadores utilizados

Para obtener la secuencia codificante de pauA (gen pauA) y de las regiones de SUAM (gen sua) se realizaron reacciones de PCR a partir de ADN genómico. El diseño de los oligonucleótidos cebadores para PauA se realizó sobre la secuencia reportada en GenBank GU392692.1, mientras que para SUAM se utilizó la secuencia DQ232760.1. Como apoyo se utilizó el programa para diseño de cebadores Primer Select-DNAstar, versión 3.01

(DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin, EE.UU.), los cuales se diseñaron considerando disminuir las probabilidades de formación de horquillas dentro de las secuencias y la dimerización de los oligonucleótidos. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados comercialmente (Genbiotech SRL, Argentina). A los oligonucleótidos diseñados, se le introdujeron, en los extremos 5', las secuencias correspondientes a sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, para permitir el posterior clonado de los mismos (Tabla 1).

Nombre y sentido	Secuencia	Enzima de restricción	Nombre de la proteína recombinante (Tamaño del producto esperado)
pauA 5'	5'- GGATCCTTTT TAATATTAATGCTTTTG-3'	BamH I	PauAr (874pb)
pauA 3'	5'-GAGCTCCAGAAAA TTT TAATGGATAC-3'	Sac I	
SUAM-1 5'	5' GAATTC TTAACGTCAACACTCGCAC 3'	EcoR I	SUAM-fr1 (727pb)
SUAM-1 3'	5' AAGCTTGCCAAACAAA TGA ATTAG 3'	Hind III	
SUAM-2 5'	5' GAATTC CACACAATCTGACGAGGT 3'	EcoR I	SUAM-fr2 (454pb)
SUAM-2 3'	5' AAGCTTGCAGAAGTTGGGGCATA 3'	Hind III	
SUAM-3 5'	5' GAATTC GAAAGTTGGGGCATA 3'	EcoR I	SUAM-fr3 (557pb)
SUAM-3 3'	5' AAGCTTCAAGTGCTCCGGTCTAT 3'	Hind III	
SUAM-4 5'	5' GAATTC CCAAGTGCTCCGGTCT 3'	EcoR I	SUAM-fr4 (558pb)
SUAM-4 3'	5' AAGCTTGAAAAAGTTGCAA AA GAAA 3'	Hind III	
SUAM-5 5'	5' GAATTC CTAGCCTTTAACTCTCA 3'	EcoR I	SUAM-fr5 (505pb)
SUAM-5 3'	5' AAGCTTTAAGAAAAATAATGCC 3'	Hind III	

Tabla.1. Cebadores específicos utilizados en este trabajo, en negrita se resalta el sitio de corte para enzimas de restricción.

III.3.1.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l, conteniendo 150 ng de ADN molde. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Ivema T-18 (Ivema Desarrollos S.R.L., Argentina). Se utilizó la mezcla de reactivos y condiciones que se detallan a continuación:

- PCR para amplificar la secuencia codificante de PauA

Mezcla de reacción	
Reactivo	Concentración Final
dNTPs	0,2 mM c/u
MgCl ₂	1,5 mM
pauA 5' / pauA 3'	0,8 μ M c/u
Buffer 5X	1X
GoTaq Promega	1 U
ADN (ng)	150

Programa de amplificación	
Desnaturalización del ADN 2 min a 94°C	
30 ciclos de reacción	
Desnaturalización del ADN	1 min a 94°C
Hibridación de los oligonucleótidos	1 min a 49°C
Síntesis de ADN	1 min a 72°C
Elongación de cadenas 5 min a 72°C	

- PCR para amplificar las secuencias codificantes de SUAM

Mezcla de reacción	
Reactivos	Concentración Final
dNTPs	0,3 mM c/u
MgCl ₂	1,5 mM
SUAM-fr5' / SUAM-fr 3'	0,3 μ M c/u
Buffer 5X	1X
GoTaq Promega	1 U
ADN (ng)	150

Programa de amplificación	
Desnaturalización del ADN 5 min a 94°C	
35 ciclos de reacción	
Desnaturalización del ADN	1 min a 94°C
Hibridación de los oligonucleótidos	1 min a 57°C
Síntesis de ADN	3 min a 68°C
Elongación de cadenas 10 min a 68°C	

III.3.1.2.4 Análisis de los productos de reacción

La evaluación de los productos de ADN obtenidos se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% preparado en buffer TAE 1X (pH: 8) y 10 mg/l de BrEt. Las alícuotas de cada reacción de PCR (10 µl) se corrieron en buffer TAE 1X a 90V durante 30 min. Posteriormente, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV, λ 255 nm (Fotodyne N3/3002, EE.UU). La documentación de imágenes, se realizó utilizando Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad Laboratories Inc., Richmond, CA, EE.UU). Como marcadores de tamaño molecular se utilizó una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño escalonado (100 bp ladder, Productos Bio-Logicos, Argentina).

III.3.1.3 Obtención del vector de expresión

La obtención del ADN plasmídico correspondiente al vector de expresión pET32a (Tabla 2), se realizó a partir de un cultivo de Escherichia coli portando el plásmido de interés crecido en 10 ml de medio LB (ANEXO 1 inciso 2.1, 1) durante 16 h a 37 °C en agitación a 180 r.p.m y en presencia de ampicilina (0,1 mg/ml). Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación (6000 r.p.m, 5 min). Luego de eliminar el sobrenadante, se realizó el protocolo de extracción de ADN plasmídico utilizando kit Wizard® Plus SV Miniprep (Promega®, Canadá), según indicaciones establecidas por el fabricante.

Plásmido	Características	Marca Comercial
pET32a	5900 pb, resistencia a Ampicilina, promotor T7lac, permite la expresión de proteínas fusionadas a 6 Histidinas (N- y C- terminal) y a la proteína tioredoxina (TRX, N-terminal). Este vector fue utilizado como sistema de expresión en la cepa BL21 (DE3) de E. coli.	Novagene, EE.UU

Tabla.2. Característica del vector plasmídico utilizado para el clonado de los fragmentos codificantes.

III.3.1.3.1 Purificación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos de interés, se purificaron a partir de la porción de gel de agarosa que contenía el ADN obtenido en la reacción de PCR. Una vez identificados los fragmentos, se purificaron utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel y PCR clean-Up System (Promega®, Canadá) según indicaciones establecidas por el fabricante.

III.3.1.3.2 Digestión de ADN

Las digestiones enzimáticas tanto del ADN plasmídico como de los amplicones codificantes de PauA o de las fracciones de SUAM, se realizaron con las endonucleasas correspondientes (BamHI-SacI para PauA y EcoRI-HindIII para las fracciones de SUAM), según instrucciones del fabricante (Promega®, EE.UU.). Brevemente, se incubaron durante 90 min a 37 °C las mezclas de ADN (0,1-1 µg), BSA 0,1mg/ml y 3 U de enzima. Los productos de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1 % (ver Mat y Met inciso 3.1.1.6) y, una vez identificados por comparación con un marcador de peso molecular adecuado, se procedió a la purificación de los fragmentos de interés mediante kit Wizard® SV Gel y PCR Clean – Up System (Promega®, Canadá) según descripciones del fabricante.

III.3.1.4 Ligación de los ADN digeridos

La reacción de ligación de cada secuencia de interés con el ADN plasmídico pET32a, digeridos previamente, se realizó incubando toda la noche a 4 °C la mezcla conteniendo 3 U de la enzima T4 DNA Ligasa (Promega®, Canadá), 1µl de Buffer 10 X en un volumen final de 10 µl, 100 ng de vector y la cantidad necesaria de inserto teniendo en cuenta una relación molar inserto: vector 3:1, siguiendo la fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \cdot \text{Kb del inserto}}{\text{kb del vector}} = \text{ng de inserto}$$

Los productos de ligación obtenidos se conservaron a -20°C hasta su uso.

III.3.1.5 Clonado de secuencias de interés

III.3.1.5.1 Preparación de células competentes

Células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) (Tabla 3), se cultivaron en caldo LB a 37°C durante 18 hs en agitación (180 r.p.m) hasta obtener un cultivo de fase estacionaria. Una fracción de éste se utilizó diluido 100 veces en el mismo medio y cultivado en las mismas condiciones hasta obtener una $DO_{550nm} = 0,5-0,6$. A partir de 1 ml del mismo, se cosecharon las células por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendieron en 500 µl de solución de transformación 1 (ST1) (ANEXO 1 inciso 2.3, 1). Luego se centrifugó, se resuspendieron las células en la solución de transformación 2 (ST2) (ANEXO 1 inciso 2.3, 2) y se las incubó en hielo, 20 min. Posteriormente, se cosecharon las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de solución ST2.

Cepa	Características	Marca Comercial
E. coli BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Novagene®, EE.UU

Tabla.3. Cepa de *Escherichia coli* utilizada en las técnicas de clonado molecular y expresión de las proteínas recombinantes.

III.3.1.5.2 Transformación de células competentes

A las células competentes contenidas en 100 µl de ST2 se agregó 5 µl de la mezcla de ligación. Posteriormente, la mezcla final se incubó en hielo por 60 min y luego se realizó shock térmico llevando la mezcla a baño de agua de 42 °C durante 45 segundos. Rápidamente se agregó 1 ml de medio LB y se mantuvo en agitación suave (100 r.p.m) a 37°C durante 60 min. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 4200 r.p.m. por 5 min, y resuspendidas en 100 µl de medio LB, las cuales fueron sembradas en placas de Petri conteniendo LB-agar (ANEXO 1 inciso 2.1, 2) suplementado con ampicilina (0,1 mg/ml). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C.

III.3.1.6 Selección de clones positivos

La selección se realizó a través de la inducción de la expresión proteica de varios clones de cada una de las secuencias clonadas. Cada clon seleccionado de las placas de transformación, se cultivó en 1 ml de caldo LB-ampicilina a 37 °C y 180 r.p.m, hasta fase exponencial. Posteriormente, se repicó diluyendo 100 veces en medio LB-ampicilina. Una vez alcanzada la fase logarítmica ($DO_{550nm} = 0,5 - 0,6$) de los cultivos, se indujo la expresión de proteínas mediante el agregado de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, Promega ®, EE.UU) 0,1 mM y se incubó 15 hs a 25°C en agitación (180 r.p.m). Posteriormente, se cosecharon las células mediante centrifugación del cultivo inducido. Las células se resuspendieron en solución de equilibrado (ANEXO 1 inciso 2.7, 1), a dicha suspensión se le agregó los inhibidores de proteasas PMSF (del inglés phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma, St Louis, MO, EE.UU) y EGTA (del inglés ethylene glycol tetraacetic acid, Sigma, St Louis, MO, EE.UU) a concentración final 1mM cada uno, con el propósito de proteger las proteínas recombinantes de proteasas bacterianas. Luego se sonicó mediante pulsos de 50% durante 2 minutos a 600W (Vibracel III, Sonics and Materials inc, Danbury, Connecticut, EE.UU). Para evaluar si el clon expresa la proteína en forma soluble o en cuerpos de inclusión, una vez obtenidas las células lisadas, se recolectó el sobrenadante y el pellet por centrifugación a 13 000 r.p.m. durante 10 minutos. El pellet se resuspendió nuevamente en solución de equilibrado. Ambas muestras se acondicionaron y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS 15%, como se indica en el inciso 3.1.8.

III.3.1.7 Análisis de identidad de clones

Aquellos clones que expresaban una proteína mayoritaria correspondiente al peso molecular esperado, fueron seleccionados para realizar extracción de ADN plasmídico como se indicó en el inciso 3.1.3. Posteriormente, se enviaron a secuenciar los ADN a la Unidad de Genómica de INTA-Castelar (Bs. As), en un secuenciador ABI 31300xl (Applied Biosystems, EE.UU) con la química BigDye (Amersham, Bharmacia, Biotech, Upsala, Suecia), utilizando el oligonucleótido T7 "terminator". Las secuencias obtenidas se

alinearon con el paquete informático libre y gratuito BLAST® (Herramientas de Búsqueda de Alineamientos Locales, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) administrado por el Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI).

III.3.1.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)

Para el análisis de las proteínas recombinantes expresadas, se empleó la técnica de separación electroforética de proteínas descrita previamente (Laemmli 1970). Las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS. El gel de apilamiento se realizó a una concentración del 4,8% de Acrilamida/Bisacrilamida en tanto que el gel de separación se preparó a concentración de 15%. Las muestras se diluyeron volumen a volumen en buffer de muestra 2X (ANEXO 1 inciso 2.4, 4), se sometieron a ebullición durante 5 minutos y se sembraron 10-15 µl de la mezcla en cada pocillo del gel. La electroforesis se realizó en el sistema Mini-Protean II® Cell (BioRad) con buffer de corrida (ANEXO 1 inciso 2.4, 3), a un voltaje constante de 200 V. Se utilizaron los marcadores de peso molecular (PM) de proteínas de PM medio no teñido (Thermo Scientific (rango: 14,4 - 116 KDa) o BioRad (rango: 14,4 - 97,4 KDa)) o Page Ruler Prestained (Thermo Scientific rango: 15 - 170 KDa).

Tinción de Coomasie, La fijación y tinción de geles se efectuó por incubación en solución colorante de Azul Brillante de Coomasie (ANEXO 1, inciso 2.5, 1) 30-45 min y posteriormente se decoloró mediante incubación de 1 hs en solución decolorante I (ANEXO 1 inciso 2.5, 2), seguida de 2 hs de incubación en solución decolorante II (ANEXO 1 inciso 2.5, 3).

Tinción argéntica, posterior a la tinción de Coomasie se llevó a cabo la técnica optimizada descrita previamente (Chevallet y col., 2006). Los geles se incubaron en solución de fijación (ANEXO 1 inciso 2.6, 1) durante 1 h, renovando la solución a los primeros 30 min. Se realizaron dos lavados de 10 min con etanol al 20 %, seguido de dos lavados de 10 min con agua destilada. A continuación se sumergieron los geles 1 min en solución de sensibilización (ANEXO 1 inciso 2.6, 2) y se volvieron a lavar en agua destilada durante 1 min. Se colocaron en solución de nitrato de plata (ANEXO 1 inciso 2.6, 3) durante 45 min, en agitación constante, y se realizó otro lavado de 10 seg en agua

destilada Se incubaron los geles en solución de revelado (ANEXO 1 inciso 2.6, 4 hasta observar la aparición de bandas y finalmente se lavaron con solución de frenado de la tinción (ANEXO 1 inciso 2.6, 5).

III.3.1.9 Solubilización de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión

Las proteínas expresadas en cuerpos de inclusión se resuspendieron en diferentes soluciones con agentes solubilizantes como: Urea 4M, Urea 8M, Tritón X-100 1%, Tritón X-100 1% con β -mercaptoetanol (β -ME) 20 mM, SDS 1% y SDS 1% con β -ME 20 mM. Al “pellet” de cuerpos de inclusión obtenido de 2 ml de cultivo se le agregó 750 μ l de solución solubilizante. Posteriormente, se incubó 1 hora a 25°C y a continuación se acondicionó la muestra y se separó en PAGE-SDS.

III.3.1.10 Purificación del panel de proteínas recombinantes a evaluar

La expresión de las proteínas recombinantes fue inducida siguiendo el protocolo detallado en el inciso 3.1.7. Se conservó el sobrenadante o pellet según correspondiera. Para la purificación se utilizó resina de pseudoafinidad cargada con Niquel-sefarosa (Ni Sepharose High Performance, Life Sciences, GE, EE.UU).

III.3.1.10.1 Purificación de proteínas recombinantes solubles

La columna de purificación fue equilibrada circulando 5 volúmenes de la solución de equilibrado. Una vez acondicionada la columna se sembró el sobrenadante con la proteína recombinante previamente acondicionada, de modo tal que contuviera una concentración final de Imidazol igual a la solución de equilibrado. El sobrenadante se recirculó dos veces por la columna para asegurarse el mayor pegado de la proteína a la resina. Posteriormente, se realizó un lavado con 10 volúmenes de buffer de equilibrado y se procedió a la elución de las proteínas adheridas a la columna. Para esto se empleó un gradiente de Imidazol en concentraciones crecientes de Imidazol solución de elución (SE2) 50 mM, SE3 100 mM, SE4 250mM y SE5 500mM (ANEXO 1 inciso 2.7). Se hicieron circular 5 volúmenes de cada solución, recolectándose fracciones de 1,5 ml. Por último, se realizó un lavado final de la columna con buffer de equilibrado y se conservó la columna en etanol al 20%. Todas las fracciones recolectadas de la purificación se analizaron por PAGE-SDS al 15%, seguida de

tinción con azul de Coomassie (ver Mat y Mat inciso 3.1.8), para determinar la pureza y la fracción de elución que contenía la proteína de interés.

III.3.1.10.2 Purificación de proteínas recombinantes insolubles.

El “pellet” de células conteniendo la proteína en cuerpos de inclusión, fue lavado con Tritón X-100 1% y, posteriormente, con PBS 1X (pH: 7,4). Una vez acondicionados los cuerpos de inclusión, se agregó la solución de equilibrado con Urea 4M. Para la purificación se procedió como se indicó en 3.1.10.1, con la variante de adicionar Urea 4M a todas las soluciones utilizadas, tanto en el lavado como en la elución.

III.3.1.10.3 acondicionamiento de las muestras de proteínas puras.

Todas las fracciones conteniendo una mayor concentración de proteína recombinante fueron agrupadas y dializadas contra buffer de conservación de proteínas (ANEXO 1 inciso 2.2, 4) y concentradas mediante ultrafiltración con membranas de 10 KDa ó 30 KDa de tamaño de corte (Vivaspin 20, GE, EE.UU). Una vez acondicionadas se cuantificaron por una técnica fluorométrica según instrucciones del fabricante (Qubit® Protein Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

III.3.2 Extracción de proteínas wild type

III.3.2.1 Extracción de SUAM

La extracción de la proteína SUAM wild type se realizó como se describió previamente (Almeida y col., 2006a). Brevemente, se partió de 100 ml de cultivo de dos cepas (SU38 y SU42) de *S. uberis* previamente caracterizadas, crecido 18 hs a 37°C a 180 r.p.m en BHI (Britania®, Argentina). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 6000xg por 5 min, posteriormente se lavaron con PBS estéril. Luego, las células cosechadas fueron resuspendidas en PBS-SDS 0,2% (p/v), utilizándose 100 µl por cada 30 mg de masa celular bacteriana. Esta mezcla se incubó durante 1 hs a 37°C, se centrifugó a 10 000xg por 5 minutos y el sobrenadante obtenido se alicuotó y conservó a -80°C.

III.3.2.2 Extracción de PauA

La proteína de excreción PauA fue extraída a partir de sobrenadante de cultivo de *S. uberis*, mediante precipitación con mezcla de metanol/cloroformo como se describió previamente (Egan y col., 2010). Brevemente, se partió de de dos cepas (SU38 y SU42) de *S. uberis*, crecido 18 hs 37°C a 180 r.p.m en BHI (Britania®, Argentina) (ANEXO 1 inciso 2.1, 3), y centrifugado a 14 000 r.p.m 10 min. Al sobrenadante recuperado se le añadió PMSF (1mM) y se eliminaron los restos celulares mediante filtración a través de un filtro de tamaño de poro 0,22 µm (Millipore, Merck, Alemania). Posteriormente, las proteínas se concentraron aproximadamente 100 veces utilizando membranas de ultrafiltración de 10 KDa de tamaño de corte (Vivaspin 20, GE, EE.UU). Para precipitar las proteínas, se añadieron 4 volúmenes de metanol y cloroformo (3:1) a 1 volumen de concentrado. La preparación se agitó en vórtex y 2 volúmenes de agua estéril se añadieron previo a la centrifugación (16 000 r.p.m, 2 min). La fase superior fue retirada cuidadosamente y desechada. Las proteínas fueron precipitadas con 3 volúmenes de metanol, y se recogieron por centrifugación (16 000 r.p.m, 2 min), el sedimento se secó al aire antes de la resuspensión en de conservación de proteínas y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Para determinar la calidad de las extracciones ambos extractos obtenidos fueron evaluados mediante PAGE-SDS 15% y coloreados con Coomassie o tinción argéntica (ver inciso III.3.1.8).

III.3.3 Evaluación de inmunogenicidad de las proteínas recombinantes

III.3.3.1 Inmunización de ratones con proteínas recombinantes

Las inmunizaciones se realizaron utilizando ratones hembras de la cepa CF1 de 6 a 8 semanas de edad. Los animales fueron criados y mantenidos en bioterio propio, con ciclos de luz:oscuridad de 12 hs y con suministro de alimento y agua ad libitum. Se utilizaron grupos de seis animales para cada grupo. A cada ratón se le inyectaron por vía intraperitoneal 20 µg por dosis, de proteína recombinante (SUAM-1fr, SUAM-2fr, SUAM-3fr, SUAM-4fr o PauAr) o SUAMwt, emulsionada con adyuvante incompleto de Freund. El esquema de inmunización consistió en tres dosis: en el día cero, a los 14 días y a los 21 días. Los grupos controles fueron inoculados con el adyuvante y solución fisiológica estéril,

siguiendo el mismo esquema de inmunización. Las muestras de suero se obtuvieron antes de la primera inoculación y 1 semana después del último refuerzo (Figura 2).

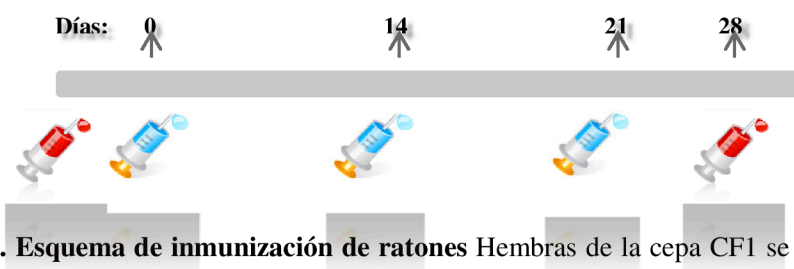


Figura.2. Esquema de inmunización de ratones Hembras de la cepa CF1 se inocularon por vía intraperitoneal con las diferentes proteínas recombinantes, en tres dosis: jeringas celestes: administración de inóculos, jeringas rojas: toma de muestra de sangre,

Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo las recomendaciones de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Ilar 2010) y fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad en la Investigación, de la FBCB.

III.3.3.2 Evaluación de inmunogenicidad de las proteínas recombinantes

III.3.3.2.1 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Microplacas de poliestireno Greiner Bio-One (GBO®, Alemania), fueron sensibilizadas durante una hora a 37°C y toda la noche a 4°C, con 0,5 µg por pocillo de proteína (recombinante o SUAMwt) disuelta en buffer carbonato pH: 9,6. Luego de bloquear los sitios de unión inespecífica con 200 µl de PBS-leche descremada 5% incubado 30 min a 37°C, se agregaron los sueros a evaluar diluidos 1/100, en PBS-leche descremada 1 %, y se incubó 1 hs a 37°C. Posteriormente, se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG Total de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch. Inc, Baltimore, MD, EE.UU), diluido 1/20 000 en PBS-leche descremada 1% y se incubó 1 h a 37°C. El sustrato de la enzima que se utilizó fue H₂O₂ en presencia del cromógeno tetrametilbencidina (TMB) (Invitrogen, Carlsbad, MO, EE.UU), y se frenó la reacción con H₂SO₄ 2N. Entre cada una de las incubaciones se realizaron 3 lavados de 60 segundos con PBS-Tween 20 0,05%. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en lector de ELISA (ELX 808, BioTek® EE.UU).

III.3.3.2.2 Titulación de los anticuerpos obtenidos al finalizar la inmunización

Los sueros obtenidos a los 7 días de la última dosis, se titularon mediante un ensayo de ELISA indirecto en las mismas condiciones que se indicó en 3.3.2.1. En este caso se utilizaron los sueros de los grupos control y experimentales, en diluciones seriadas al medio, desde 1/5000 a $1/4 \times 10^7$, y los títulos se calcularon como la máxima dilución a la cual la $D.O_{450nm}$ se mantenía por encima de la línea de corte. La línea de corte se estableció como la $D.O_{450nm}$ media de todas las diluciones ensayadas para los sueros controles más 2 desvíos estándar.

III.3.4 Evaluación de especificidad de anticuerpos

III.3.4.1 Ensayos de inmunodetección (Western blot)

Las proteínas (recombinantes y wild type) y homogenato de *E. coli* fueron separadas en PAGE-SDS 15% (ver inciso 3.1.8). A continuación se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa con porosidad de 0,45 μm (Amersham, Bharmacia, Biotech, Upsala, Suecia), utilizando el sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot® Electrophoretic transfer cell (BioRad). La transferencia se realizó durante 1 h a 100 V en presencia de buffer de transferencia (ANEXO inciso 2.8, 1). Para el inmunorrevelado, las uniones inespecíficas se bloquearon con leche descremada al 5 % en PBS 1X durante 1 h a 25°C. Seguidamente, se incubó 1 h a 25°C con una dilución 1:50 de los sueros a evaluar en PBS-leche descremada al 1 %. Posteriormente, se incubó 1 h a 25°C con un anticuerpo secundario anti-IgG total de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch, Baltimore, MD, EE.UU) en una dilución 1:7000 en PBS-leche descremada al 1 %. El revelado se realizó con H_2O_2 en presencia del cromógeno diaminobencidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU). Posterior a cada incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 0,05 %. Como referencia de tamaño se utilizó marcador de peso molecular pre-teñido, rango: 10 - 170 KDa (TermoScientific®, Waltham, MA, EE. UU).

III.3.4.2 Ensayos de inmunodetección (ELISA)

Placas de poliestireno Greiner Bio-One (GBO®, Alemania), fueron sensibilizadas con 0,5 µg de antígenos de las distintas fracciones recombinantes así como 0,5 µg SUAMwt, por pocillo, y se enfrentaron a los sueros (dilución 1:100) obtenidos de la inmunización con SUAMwt. Control positivo (+): sueros anti-SUAMwt, control negativo (-): sueros de animales inmunizados con adyuvante sin inmunógeno hacia anti-SUAMwt. El ensayo se realizó como se indicó en el inciso 3.3.2.1.

III.3.5 Ensayos de funcionalidad de anticuerpos Policlonales específicos anti-SUAM

III.3.5.1 Ensayo de capacidad de inhibición de adherencia.

III.3.5.1.1 Preparación de las bacterias

El aislamiento SU42 de *S. uberis* fue cultivado en agar Tripteína Soya (Britania, Argentina) suplementado (ANEXO 1 inciso 1.1, 1) 18 hs a 37°C. Posteriormente, las bacterias se resuspendieron en solución fisiológica estéril y el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se cuantificó por dilución en placas de agar Tripteína Soya (Britania, Argentina) suplementado. Se llevó la suspensión a una concentración de aproximadamente $1,8 \times 10^7$ UFC/ml, en medio un Medio de Crecimiento Celular (MCC): Medio Dulbecco modificado por Eagle suplementado (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina) (ANEXO 1 inciso 2.9).

III.3.5.1.2 Células epiteliales mamarias bovinas

Los ensayos de adherencia se llevaron a cabo utilizando la línea de células epiteliales de glándula mamaria bovina, MAC-T. La línea celular fue obtenida mediante la transfección de células alveolares mamarias bovinas con el antígeno T de SV-40 (Huynh y col., 1991). Las células congeladas en nitrógeno líquido fueron resuspendidas en MCC para su crecimiento. Se sembraron 0,5 ml de la suspensión en una frascos T de cultivo de tejidos, y se incubó a 37°C con 5% CO₂. Al cabo de 48 hs se descartó el MCC, se lavó la

monocapa con PBS y se agregó 100 µl de tripsina 0,25 %-EDTA 0,1 % (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina). El número de células viables fue estimado por recuento en cámara de Neubauer con Azul Tripán 0,4%. Las células fueron diluidas con medio MCC y se distribuyeron 150 000 células en cada pocillo en placas estériles de 24 pocillos con fondo plano (Nunc, Melbourne, Australia), para lograr $2,5 \times 10^5$ células/ml aproximadamente a las 24 hs.

III.3.5.1.3 Ensayo de adherencia

Los ensayos de inhibición de la adherencia en células epiteliales mamarias (MAC-T) se realizaron según lo descrito por Prado y colaboradores (Prado y col., 2011). Las monocapas de las células MAC-T en confluencia se lavaron 3 veces con PBS y se agregó 500 µl de medio MCC. Para determinar el número de células en cada pocillo, se realizó recuento sobre uno de ellos en cámara de Neubauer con azul Tripán 0,4%, previamente al agregado de 100 µl de tripsina 0,25 %-EDTA 0,1 % (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina). Dos ml de la suspensión de *S. uberis* en RPMI (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina) se opsonizaron durante 1 h a 37°C con una mezcla de los sueros obtenidos al finalizar la inmunización de cada grupo de animales. Los sueros fueron previamente descomplementados mediante incubación durante 30 min a 56°C (1:100). La cantidad de bacterias utilizadas fue la necesaria para obtener una Multiplicidad de Infección (MOI) teórica de 10.

Luego, cada mezcla de sueros con bacterias se agregó a las monocapas de MAC-T por triplicado, las placas de cultivo se centrifugaron durante 5 min a 600xg y se incubaron durante 2 hs a 37°C en 5% de CO₂. Luego, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS. Las monocapas se despegaron por incubación con Tripsina 0,25% EDTA 0,1% (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina) por 5 min. Se realizaron 5 diluciones seriadas al décimo de los contenidos de cada pocillo, de los cuales se sembraron 20µl, por duplicado, en placas con agar Sangre. Luego de incubar durante 18 hs a 37°C se contó el número de UFC recuperadas. Cada muestra se procesó por triplicado y el ensayo se repitió 3 veces. Los resultados fueron expresados como porcentaje de adherencia, considerando como el 100%

de adherencia al número de bacterias recuperadas luego de la opsonización de las mismas con los sueros del grupo sin inmunógeno (control).

III.3.5.2 Ensayo de fagocitosis

III.3.5.2.1 Tinción de bacterias con FITC

A partir de un cultivo de *S. uberis* (SU42) crecido 18 hs a 37°C en placas de en agar Tripteína Soya (Britania, Argentina) suplementado, se cosecharon las bacterias en 20 ml de solución fisiológica estéril. Posteriormente, se centrifugaron 3 min a 12 000 r.p.m y se resuspendieron en 10 ml de solución de NaHCO₃ (pH: 9), al cual se agregaron 100 µl de FITC (de sus iniciales en inglés Fluorescein IsoThioCyanate) (Sigma, Sta Luois, MO, EE.UU) 10 mg/ml disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU). La mezcla se incubó 1 h a 25°C y en oscuridad. Para eliminar el exceso de FITC se hicieron lavados sucesivos con PBS estéril hasta que el sobrenadante se observó sin coloración. Finalmente, se resuspendió en 10 ml de Solución Fisiológica estéril, se centrifugó 3 min a 12 000 r.p.m y se conservó el sedimento celular a -20°C hasta su utilización.

III.3.5.2.2 Obtención de células

Se utilizaron 3 ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 semanas de edad provistos por el Centro de Medicina Comparada del ICiVet-Litoral (UNL-CONICET), a los cuales se les inyectó por vía intraperitoneal 3 ml de una solución de medio Tioglicolato al 3% según se describió previamente (Zhang y col., 2008). Luego de 4 hs se realizó la extracción de células de peritoneo. El líquido peritoneal se recolectó en RPMI (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina), se centrifugó a 1400 r.p.m 5 min y se resuspendió en medio RPMI fresco. El recuento de células totales (macrófagos y leucocitos polimorfonucleares) se realizó en cámara de Neubauer con solución de Turk (ANEXO inciso 2.10, 7) y el recuento de células viables con Azul de Tripán 0,4%.

III.3.5.2.3 Fagocitosis in vitro

Se utilizó una mezcla de los sueros obtenidos al día 7 post-inmunización para cada uno de los grupos a evaluar. Previa descomplementación (30 min a 56°C) de los sueros, se incubaron 100 µl de la suspensión de bacterias-FITC (1×10^7 UFC) con la mezcla de sueros correspondiente a cada grupo en una dilución 1:100 en 300 µl de RPMI (Laboratorio MicroVet SRL, Argentina). La mezcla se incubó en oscuridad durante 30 min a 37°C con agitación suave. Posteriormente, se agregaron 100 µl de la suspensión de células (1×10^6 cél.) y se incubó por otros 30 min, en agitación suave. Transcurrido dicho tiempo se frenó la reacción con 500 µl de solución de “frenado” fría (ANEXO 1 inciso 2.10, 3). La mezcla de reacción se centrifugó durante 5 min a 1400 r.p.m., las células se resuspendieron en 200 µl de 5 µg/ml BrEt (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU) en PBS y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 1400 r.p.m para eliminar los restos de BrEt y se resuspendieron los pellets en 200 µl de buffer de citometría (ANEXO 1 inciso 2.10, 4) suplementado con 1% de formol, incubando 1 h a 25°C. Finalmente, se centrifugó nuevamente y se resuspendió en buffer de citometría. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Como controles se utilizaron bacterias opsonizadas sin células, células sin bacterias y bacterias no opsonizadas sin células. Las muestras se conservaron a 4°C y en oscuridad hasta su lectura.

III.3.5.2.4 Citometría de flujo

Las mediciones se realizaron en un citómetro de flujo Guava EasyCyte™, (Guava Technology, EE.UU). Las muestras se procesaron por triplicado y para cada punto se adquirieron 10 000 eventos. La región conteniendo a los PMN y Mf, se seleccionó teniendo en cuenta los parámetros de tamaño y complejidad citoplasmática. La intensidad de fluorescencia sobre R se graficó en histogramas de escala logarítmica. Los datos se analizaron con el programa Guava CytoSoft™ versión 2.6. Se determinó el porcentaje de células con bacterias internalizadas y se utilizó el parámetro de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) como una estimación del número de bacterias internalizadas por célula positiva.

III.3.6 Ensayo de unión a lactoferrina

La capacidad de unión a LF de las distintas fracciones recombinantes de SUAM se evaluó a través de un ensayo de ELISA. En el mismo, microplacas de poliestireno Greiner Bio-One (GBO®, Alemania), fueron incubadas 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C con 10 ng de lactoferrina bovina (Sigma, Sta Louis, MO, EE.UU), disuelta en buffer carbonato pH 9,6. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon con PBS-albúmina sérica bovina 3% incubando 30 min a 37°C. Posteriormente, se incubó 1 hs a 37°C, con 100 ng (0,89 nmoles) de SUAMwt y 0,89 nmoles de cada una de las fracciones recombinantes de SUAM. Posteriormente, se incubó con los sueros que reconocen cada proteína, diluidos 1:500 en PBS. Luego, se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG Total de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch, EE.UU), diluido 1:16 000 en PBS. El sustrato de la enzima que se utilizó fue H₂O₂ en presencia de TMB (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU) y se frenó la reacción con H₂SO₄ 2N. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en lector de ELISA (ELX 808, BioTek, EE.UU). Luego de cada incubación se realizaron tres lavados de 1 min con PBS.

La unión de las fracciones SUAM-1fr, -2fr, -3fr o -4fr recombinantes a LF se expresó como DO₄₅₀ y como relación porcentual respecto a la señal obtenida para cada fracción comparada a la señal obtenida para SUAMwt tomando esta como un 100%.

III.3.7 Evaluación de actividad de PauAr y funcionalidad de los anticuerpos

III.3.7.1 Extracción de plasminógeno bovino

III.3.7.1.1 Obtención de plasma

La muestra de plasma bovino fue tomada en la animales de la estación Experimental INTA Rafaela, por un médico veterinario; se utilizaron bolsas para extracción sanguínea (Rivero, código S-91, Argentina) con solución anticoagulante de citrato de sodio 2,63 gr%, ácido cítrico 0,3 gr % y dextrosa 3,19 gr%. Se les añadió PMSF (Sigma, Chemical Co., St.

Louis, MO, EE.UU) disuelto en DMSO (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU), a una concentración final de 1 mM, con el fin de inhibir la actividad de las serino-proteasas. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y los plasmas se separaron por centrifugación a 7000 r.p.m durante 15 min a 4 °C (Cañas Bermudez. O y col., 2006). Previamente a la purificación se agregó al plasma obtenido, EDTA a una concentración final 0,003 M.

III.3.7.1.2 Purificación de plasminógeno

El plasminógeno se purificó por cromatografía de afinidad en lisina-sefarosa, según el método de Deutsch y Mertz (Deutsch y col., 1970). Se utilizó una columna de sefarosa 4B preactivada con Bromuro de Cianógeno (GE Healthcare) a la cual se unió lisina (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU), según instrucciones del fabricante. Posteriormente fue empaquetada, equilibrada con tres volúmenes de la solución tampón conteniendo: 0,1 M buffer fosfato pH 7,3 y 0,15 M de Cloruro de Sodio pH 7,3, a una velocidad de flujo de 2 ml/min, y se aplicaron 250 ml de plasma. Posteriormente, la columna se lavó con 4 volúmenes de solución tampón y se eluyó con 100 ml de PBS que contenían 0,05M ϵ -ácido aminocaproico (ϵ -ACA); la concentración proteica se determinó utilizando técnica fluorométrica según instrucciones del fabricante (Qubit® Protein Assay Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU).

III.3.7.2 Ensayo de actividad

Para demostrar la actividad de la proteína PauAr se realizó un ensayo de actividad caseinolítica según se describió previamente (Leigh 1993). Brevemente, en pocillos realizados sobre agar-leche descremada al 1%, se sembraron 10 μ l de las proteínas PauAwt o PauAr en presencia de plasminógeno (10 μ g/ml) bovino. Como controles, se utilizaron pocillos sin plasminógeno y pocillos sin PauAr o PauAwt. Se incubó 16 hs a 37°C y se evidenció la actividad por la presencia de un halo claro alrededor del pocillo de siembra.

III.3.8 Análisis estadísticos

Las comparaciones estadísticas de los resultados se llevaron a cabo por medio el programa GraphPad (PRISM, versión 7.0, San Diego, EE.UU). Las diferencias se analizaron mediante Kruskal Wallis, seguido por test de Mann Whitney o post test Dunn, para detectar diferencias entre pares ($p < 0,05$).

III.4 RESULTADOS

III.4.1 Predicción de epítopes para la proteína SUAM

Con el propósito de encontrar regiones en la secuencia codificante de la proteína SUAM que presenten epítopes B potencialmente inmunogénicos, se realizó un estudio de predicción de epítopes B lineales. Tanto con el software ABCpred (Figura 3) como con AAPPred (ANEXO 2) se observó una distribución homogénea de probables epítopes B a lo largo de toda la secuencia.

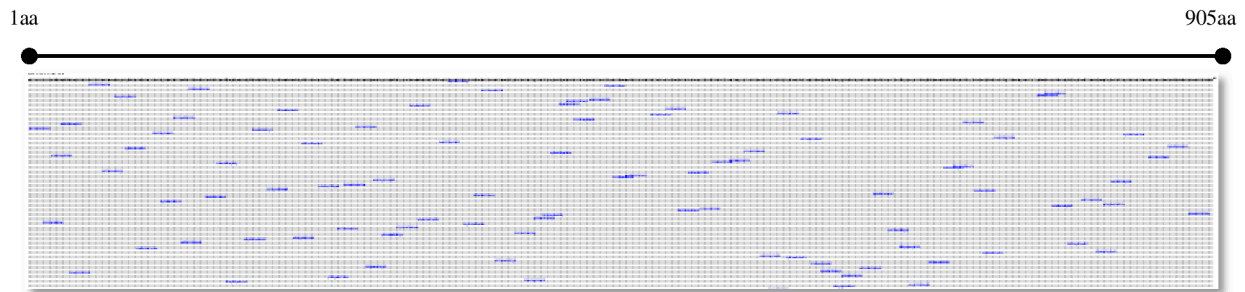


Figura.3: Mapa de predicción de epítopes B con ABCpred en el gen sua, seleccionando péptidos con una longitud de 15 aminoácidos. En azul se muestran los posibles péptidos antigénicos a lo largo de la secuencia. Las distintas líneas son consecuencia de que parte de algunos péptido se solapan.

Debido a la distribución homogénea de epítopes B a lo largo de la secuencia codificante de SUAM, se decidió clonar 5 fracciones de la molécula, que comprendieran la mayor parte de la secuencia codificante (Tabla 4).

Proteína	Región de la secuencia codificante de SUAM	Tamaño
SUAM-1fr	217 a 919 pb	727 pb
SUAM-2fr	649 a 1114 pb	455 pb
SUAM-3fr	1111 a 1625 pb	557 pb
SUAM-4fr	1618 a 2119 pb	598 pb
SUAM-5fr	2158 a 2640 pb	505 pb

Tabla.4. Regiones a clonar de la secuencia codificante de SUAM. Se observa la posición de la secuencia codificante de SUAM dentro de la secuencia completa codificante de SUAM, para cada una de las fracciones a clonar y la longitud de cada fracción.

III.4.2 Clonado de factores de virulencia

III.4.2.1 Aislamiento de la secuencia codificante de cada fracción de SUAM y PauA

Inicialmente se amplificaron los 5 fragmentos que forman parte de la proteína SUAM y PauA completas a partir de ADN genómico (ver inciso 3.1.2.1) del aislamiento SU05 de *S. uberis*, mediante PCR. La caracterización del aislamiento SU05 fue descrita en el Capítulo II de este trabajo. Los tamaños teóricos para cada fragmento coincidieron con el tamaño del producto obtenido (Figura 4). Al mismo tiempo se obtuvo ADN plasmídico correspondiente al vector pET32a.

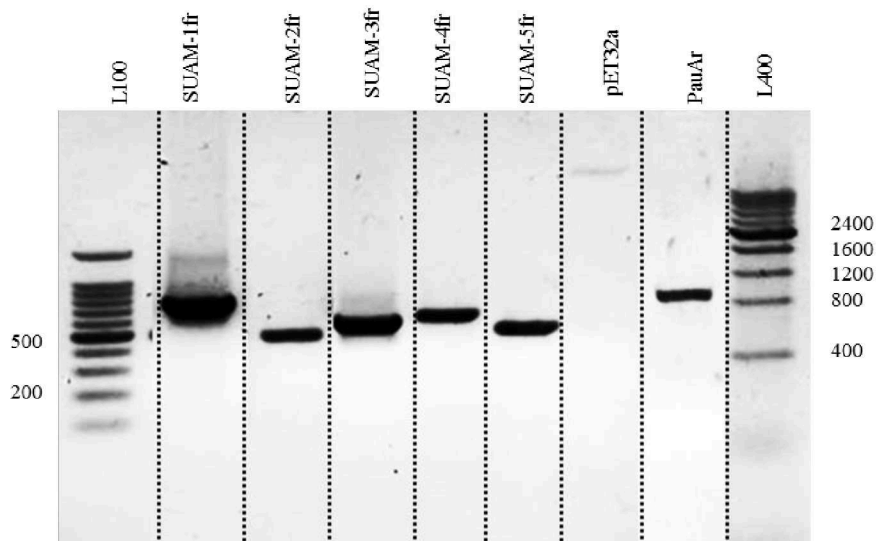


Figura.4. Productos de amplificación por PCR de las secuencias codificantes de PauA y las fracciones de SUAM. SUAM-fr1 (727pb), SUAM-fr2 (454pb), SUAM-fr3 (557pb), SUAM-fr4 (558pb), SUAM-fr5 (505pb) y PauAr (874pb). pET32a: vector cortado con enzimas de restricción (PM: 5900pb), es el vector de expresión cortado con

las enzimas EcoRI/HindIII. En los extremos se encuentran dos marcadores de peso molecular L100 pbl®, L400 pbl®.

III.4.2.2 Clonado en vector plasmídico pET32a

Con el fin de obtener cada una de las proteínas recombinantes deseadas, cada fragmento amplificado de la secuencia codificante de SUAM, fue digerido con las enzimas EcoRI y HindIII. El producto amplificado codificante para PauA, fue digerido con las enzimas BamHI y SacI. La digestión del vector de expresión pET32a se realizó con cada par de endonucleasas. Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) competentes con la mezcla de ligación y se seleccionaron en placas conteniendo agar-LB suplementado con ampicilina. Se escogieron clones bacterianos al azar y se analizaron mediante inducción con IPTG, aquellos clones que eran capaces de expresar la proteína recombinante (Figura 5). Siguiendo esta estrategia se pudieron obtener clones para 4 de las 5 fracciones de la proteína SUAM, y clones de PauA, que expresaron las proteínas SUAM-1fr y SUAM-4fr en forma soluble y SUAM-2fr, SUAM-3fr y PauAr en forma insoluble. La fracción SUAM-5fr no se logró expresar. Debido al sistema de expresión utilizado todas las fracciones se obtuvieron fusionadas a la proteína tioredoxina (TRX) y a una secuencia de 6 histidinas (tags) en el extremo N-terminal. Por este motivo, todas las proteínas recombinantes presentan 20,9 KDa adicionales a su peso molecular.

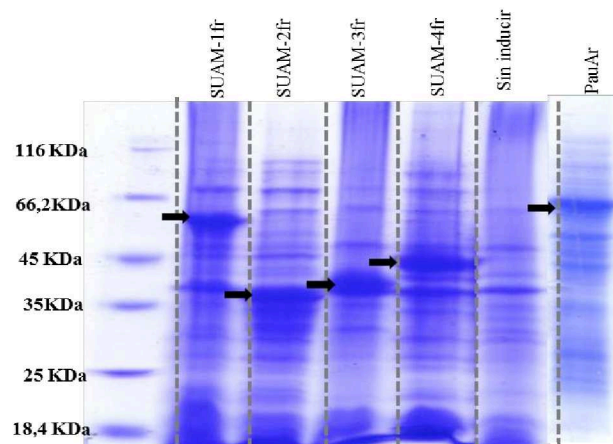


Figura.5. Caracterización electroforética de las proteínas recombinantes obtenidas. PAGE-SDS al 15% para identificar clones productores de las proteínas recombinantes, inducidos con IPTG. Izquierda de la imagen, marcador de peso

molecular ThermoScientific®, SUAM-1fr (PM: 47,5 = 26,6 SUAM-1fr KDa + 20,9 KDa Tags), SUAM-2fr (PM: 37,9 = 17 SUAM-2fr KDa + 20,9 KDa Tags), SUAM-3fr (PM: 40,6 = 19,7 SUAM-3fr KDa + 20,9 KDa Tags), SUAM-4fr (PM: 42,9 = 22 SUAM-4fr KDa + 20,9 KDa Tags). SI: cultivo de E. coli BL21 (DE3) sin inducir (SI). PauAr: PauAr (PM: 52,9 = 32 PauAr KDa + 20,9 KDa Tags).

III.4.2.3 Análisis de identidad de clones

La identidad de aquellos clones productores de las proteínas recombinantes correspondientes fue confirmada mediante secuenciación a partir de preparación plasmídica y posterior secuenciación con el oligonucleótido “T7 terminator”. La identidad con las secuencias disponibles en GenBank para los clones obtenidos fue entre un 94 - 99%. Todas las secuencias alinearon específicamente sólo con secuencias de los genes (sua o pauA) y con el genoma completo disponible en la base de datos Gen Bank (gen sua: DQ232760, gen pauA: GU392692.1, genoma completo de S. uberis: AM946015.1)

El análisis de las secuencias de los clones obtenidos reveló que algunas poseen menor identidad hacia las secuencias disponibles en GenBank que otras, como es el caso de SUAM-1fr y PauAr, que presentaron 94-96%, mientras que las secuencias de SUAM-2fr, -3fr y 4fr mostraron 98-99%.

III.4.2.4 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes obtenidas

Con el objetivo de obtener las proteínas recombinantes puras (eliminando los restos celulares y proteínas de origen bacteriano) y a la vez concentradas, se realizó la purificación de las mismas. Para ello se seleccionaron aquellos clones con un alto nivel de expresión bajo las condiciones ensayadas. La expresión se realizó como se describió previamente, en un sistema procariota de E. coli, utilizando la cepa BL21 (DE3), bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Para la purificación de proteínas se deben considerar: la forma de expresión, soluble o insoluble. Con el sistema utilizado, se logró obtener dos proteínas que se expresan en forma soluble: SUAM-1fr y SUAM-4fr, mientras que SUAM-2fr, SUAM-3fr y PauAr se obtuvieron en forma de cuerpos de inclusión.

III.4.2.4.1 Purificación de las proteínas recombinantes obtenidas en forma soluble

Las fracciones SUAM-1fr y SUAM-4fr fueron purificadas utilizando el sistema de purificación por pseudoafinidad de unión a iones Ni^{2+} . Las fracciones recolectadas de la elución en el proceso de purificación se separaron en PAGE-SDS 15% para evaluar la pureza (Figuras 6 y 7). Las fracciones con mayor concentración de proteína recombinante y menor cantidad de impurezas se juntaron y, con el propósito de eliminar el Imidazol, se diluyeron las muestras en buffer de conservación de proteínas, y se concentraron mediante ultracentrifugación.

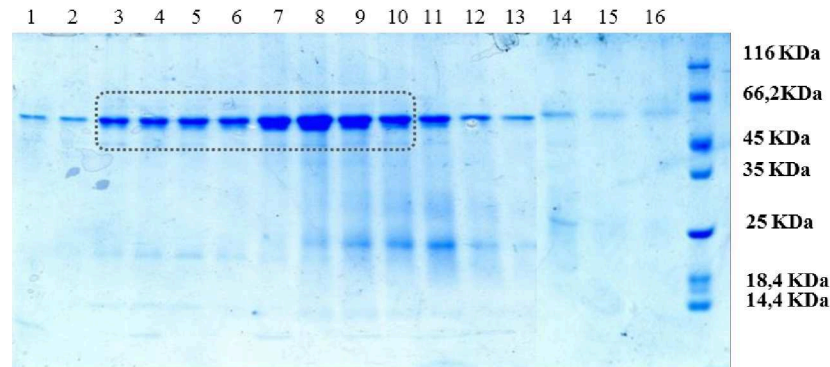


Figura.6. Purificación de SUAM-1fr por cromatografía de pseudoafinidad por unión a Níquel. PAGE-SDS 15% de las fracciones de elución obtenidas de la purificación en columna de pseudoafinidad de la proteína SUAM-1fr (PM: 47,5 = 26,6 KDa SUAM-1fr + 20,9 KDa Tags). Elución con Imidazol 20 mM (calles 1-2), 50 mM (calles 3-5), 100 mM (calles 6-9), 250 mM (calles 10-13) mM y 500 mM (calles 14-16). Marcador de peso molecular ThermoScientific®. Recuadro negro, engloba las muestras que se juntaron, dializaron y conservaron.

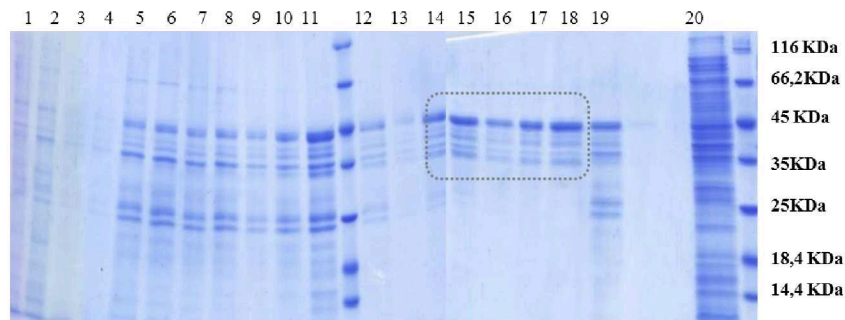


Figura.7. Purificación de SUAM-4fr por cromatografía de pseudoafinidad a Níquel. PAGE-SDS 15% de las fracciones de elución obtenidas de la purificación en columna de pseudoafinidad de la proteína (PM: 39,5 = 18,6 KDa SUAM-4fr + 20,9 KDa Tags). Elución con Imidazol de 20 (calles 1-4), 50 (calles 5-8), 100 (calles 9-11), 250 (calles 12-14) mM y 500 mM (calles 15-20). E: fracción de elución previa al pasaje del gradiente de Imidazol. Marcador de peso molecular: ThermoScientific®. Recuadro negro, engloba las muestras que se juntaron, dializaron y conservaron.

III.4.2.4.2 Purificación de las proteínas recombinantes obtenidas en forma insoluble

Como se mencionó anteriormente, las fracciones SUAM-2fr y SUAM-3fr y la proteína PauAr, se obtuvieron en forma insoluble, utilizando el mismo sistema de expresión (pET23a).

Luego de cosechar las células, las mismas fueron lisadas y el sedimento obtenido fue tratado con diferentes agentes con el interés de encontrar aquel, que mejor solubilizara las proteínas en cuestión y a su vez permitiera la interacción con la resina de sefarosa-Ni²⁺. Las muestras se trataron con: Urea 4M, Urea 8M, Tritón X-100 1%, Tritón X-100 1% - β-ME 20 mM, SDS1% y SDS 1% - β-ME 20 mM. A modo de ejemplo se muestra la solubilización de una de las proteínas recombinantes obtenidas en forma insoluble (Figura 8).

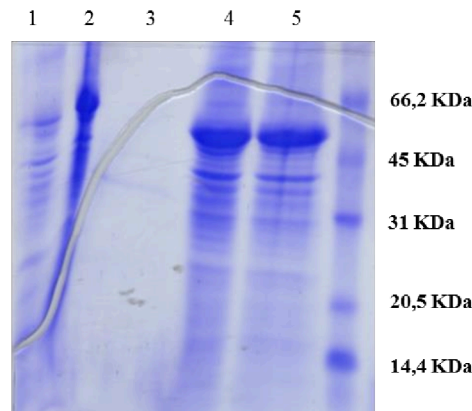


Figura.8. Ensayo de solubilización de proteínas recombinantes expresadas en forma insoluble. PAGE-SDS 15% de proteína PauAr tratada en diferentes condiciones para lograr su purificación. Agentes solubilizantes: Urea 8M (calle 1); Urea 4M (calle 2); Tritón 1% + β-ME 20 mM (calle 3); SDS 1% (calle 4); SDS 1% + β-ME 20mM (calle 5).

Las condiciones que permiten solubilizar la proteína son las perteneciente a las calles 1, 2, 4 y 5. Marcador de peso molecular: BioRad.

Como se puede observar en la Figura 8 todas las condiciones, exceptuando el Tritón X100 1% con β -ME, lograron solubilizar la proteína. Este resultado se obtuvo también con las restantes proteínas recombinantes insolubles (SUAM-2fr, SUAM-3fr y PauAr). Sin embargo, solamente la solubilización con Urea 4M permitió la interacción de las proteínas con la columna. Dado que el Tritón X100 1% es capaz de solubilizar proteínas celulares de unión a membrana por su capacidad detergente (Schnaitman 1971), se lo utilizó para lavar los cuerpos de inclusión, previo al agregado de la Urea 4M. En el caso particular de SUAM-3fr, se observó que, luego de lavar los cuerpos de inclusión con Tritón X-100 1% y posterior solubilización con Urea, la proteína presentó una alta pureza, evidenciado con una tinción argéntica (Figura 9). Este tipo de tinción presenta una mayor sensibilidad en relación a la tinción con Coomasie (Morrissey 1981). En relación a los lavados con Tritón X-100 1% (Figura 9, calle 2), posiblemente las impurezas extraídas no se detectaron debido al volumen utilizado para los lavados (140 ml) en el cual las impurezas extraídas quedarían diluidas. Dada la excelente pureza obtenida no fue necesario realizar la purificación en columna de pseudoafinidad

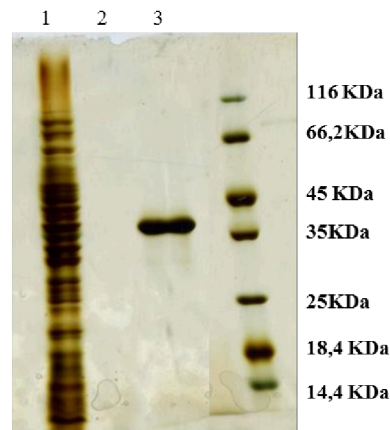


Figura.9. Purificación de SUAM-3fr. PAGE-SDS 15% de los diferentes pasos de lavados de los cuerpos de inclusión: sobrenadante luego de la lisis celular y separación por centrifugación (calle 1), lavados con Tritón X 100 1% (calle 2), cuerpos de inclusión tratados con Urea 4M, luego de los lavados con Tritón X-100 1% (calle 3), donde se

observa una única banda correspondiente a SUAM-3fr (PM: $40,6 = 19,7$ SUAM-3fr KDa + $20,9$ KDa Tags). Marcador de peso molecular: ThermoScientific®.

En los casos de SUAM-2fr y PauAr, luego de los lavados con Tritón X-100 1% y solubilización con Urea 4 M, se realizaron purificaciones por pseudoafinidad. Las fracciones recolectadas de la purificación de SUAM-2fr, fueron separadas en PAGE-SDS 15% para evaluar su pureza (Figura 10). La proteína, eluída con una concentración de Imidazol de 250 mM, se obtuvo concentrada y con una alta pureza.

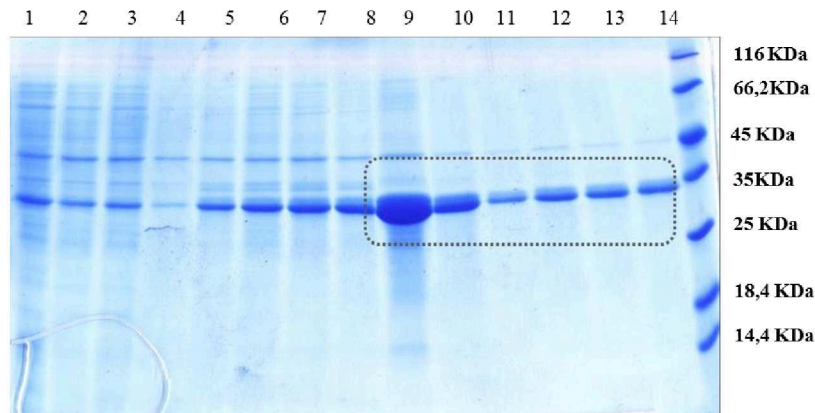


Figura.10. Purificación de SUAM-2fr por cromatografía de pseudoafinidad por unión a Níquel. PAGE-SDS 15% de las fracciones de elución obtenidas de la purificación en columna de pseudoafinidad de la proteína SUAM-2fr (PM: $37,9 = 17$ KDa SUAM-2fr + $20,9$ KDa Tags): en la imagen se puede ver la elución con Imidazol de 20 mM (calles 1-2), 50 mM (calles 3-5), 100 mM (calles 6-9) y 250 mM (calles 10-14). Marcador de peso molecular ThermoScientific®. Recuadro negro, engloba las muestras que se juntaron, dializaron y conservaron.

En relación a PauAr, se obtuvo la proteína con una alta pureza y concentración. La proteína eluyó con una concentración de Imidazol 500 mM (Figura 11). En este caso se realizaron dos purificaciones sucesivas, de la primera purificación se recolectaron las fracciones con mayor concentración y se volvieron a purificar con un gradiente de 100 a 500 mM de Imidazol, ya que se observó que eluyó tardíamente. En la Figura 11 se puede observar una banda de peso molecular ligeramente superior a 116 KDa. Mediante una electroforesis en presencia y ausencia de agente reductor (datos no mostrados), se

corroboró que esto se debe a la formación de dímeros de la proteína, no separados por el agente reductor del buffer de siembra.

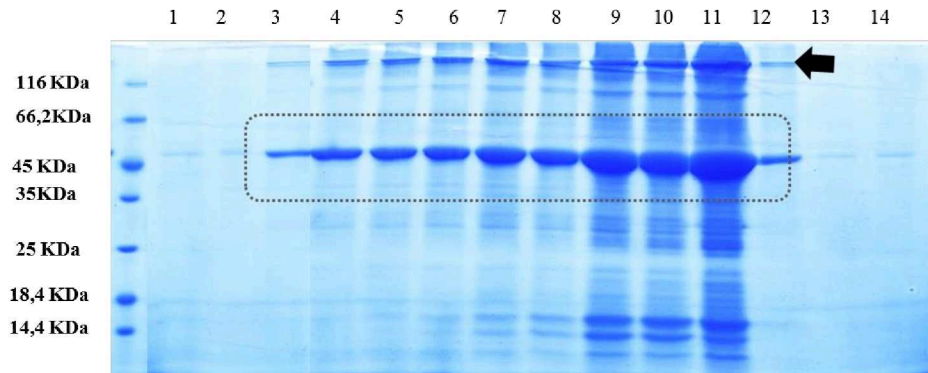


Figura.11. Purificación de PauA por cromatografía de pseudoafinidad por unión a Níquel. PAGE-SDS 15% de las fracciones de elución obtenidas de la purificación en columna de pseudoafinidad de la proteína PauAr (PM: 50,9 = 30 PauAr KDa + 20,9 KDa Tags). Elución con Imidazol de 100 mM (calles 1-2), 250 mM (calles 3-6) y 500 mM (calles 7-14). La flecha indica la formación de dímeros. Marcador de peso molecular: ThermoScientific®. Recuadro negro, engloba las muestras que se juntaron, dializaron y conservaron.

Todas las fracciones recolectadas para cada proteína, posterior a su acondicionamiento en Buffer de conservación de proteínas pH: 7,3 (Figura 12), se cuantificaron mediante método fluorométrico y se calcularon los rendimientos obtenidos (Tabla 5).

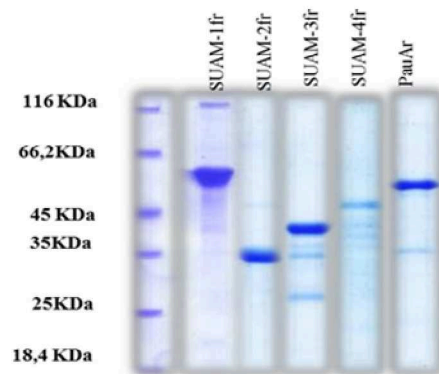


Figura. 12. Caracterización electroforética de las proteínas recombinantes purificadas. PAGE-SDS 15% de fracciones de proteínas puras acondicionadas.

SUAM-1fr PM: 47 KDa; SUAM-2fr PM: 37,9 KDa; SUAM-3fr PM: 40,6 KDa;
 SUAM-4fr PM: 42,9 KDa; PauAr PM: 52,9 KDa.

Proteína	Masa de proteína obtenida (mg)	Volumen de cultivo (ml)	Rendimiento (mg/l)
SUAM-1	90	600	150
SUAM-2	3,24	100	32,4
SUAM-3	14,1	300	47
SUAM-4	2,8	200	14
PauA	18,6	600	31

Tabla.5. Rendimientos obtenidos en la purificación de proteínas recombinantes, expresados en mg/l de cultivo.

III.4.3. Extracción de las proteínas wild type de cepas caracterizadas de *S. uberis*

Para la obtención de las proteínas wild type de los factores de virulencia, se trabajó con dos aislamientos de *S. uberis* del cepario armado durante el desarrollo de este trabajo de Tesis. Los aislamientos seleccionados (SU38 y SU42) fueron diferentes a los utilizados para el aislamiento de la secuencia a clonar (SU05) con el propósito de determinar la especificidad de los anticuerpos hacia cepas heterólogas. Para la obtención se utilizó un protocolo de extracción de proteínas de superficie (SUAM) y otro para proteínas de excreción (PauA) (ver Mat y Met, inciso 3.2).

La presencia de los factores de virulencia parcialmente purificados se analizó por medio de PAGE-SDS (Figura 13).

Mediante el protocolo de extracción de proteínas de superficie se obtuvo, en ambas cepas, una proteína con un peso molecular aproximado a 112 KDa, coincidente con el PM de SUAMwt (Almeida y col., 2006a). La extracción de SUAMwt resultó de una pureza mayor con la cepa SU42, por lo cual se la eligió para ensayos posteriores. Por otra parte, la

extracción de PauA presentó una banda de aproximadamente 35 KDa, correspondiente al PM de PauAwt, además de otras bandas correspondientes a proteínas no identificadas, que co-purifican durante la extracción. La extracción no permitió obtener la proteína PauAwt concentrada. El extracto conteniendo la proteína PauAwt, fue similar para las dos cepas utilizadas, por lo cual, se eligió trabajar con la misma cepa que para SUAMwt (SU42).

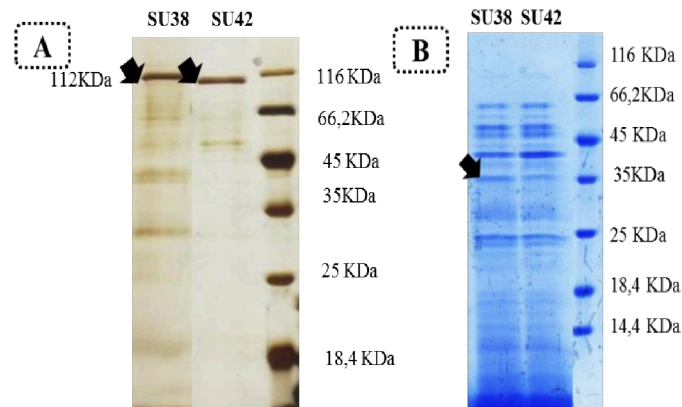


Figura.13. Extracciones de proteínas PauA y SUAM wild type de dos aislamientos regionales de *S. uberis* (SU38 y SU42). PAGE-SDS 15% A: Extracción de SUAMwt. B: Extracción de PauAwt. Las flechas indican las proteínas de interés. Marcador de peso molecular: ThermoScientific®.

III.4.4 Evaluación de la respuesta inmune humoral en ratones

III.4.4.1 Determinación de IgG

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de los factores de virulencia SUAM y PauA recombinantes, se inocularon ratones de la cepa CF1 con 20 μ g de cada una de estas proteínas recombinantes o de SUAMwt siguiendo el protocolo descrito en el inciso 3.3.1. Luego, se midieron los niveles de IgG específica, mediante ELISA indirecto contra la proteína correspondiente, en el suero obtenido 7 días después del último refuerzo. Los niveles de anticuerpos generados tanto en todos los grupos inmunizados con proteínas recombinantes como con SUAMwt superaron significativamente a los del grupo control ($p < 0,0001$; Test Kruskal-Wallis) (Figura 14 y 15). Ninguno de los grupos inmunizados presentó, en los sueros pre-inmunes, anticuerpos específicos contra las proteínas evaluadas.

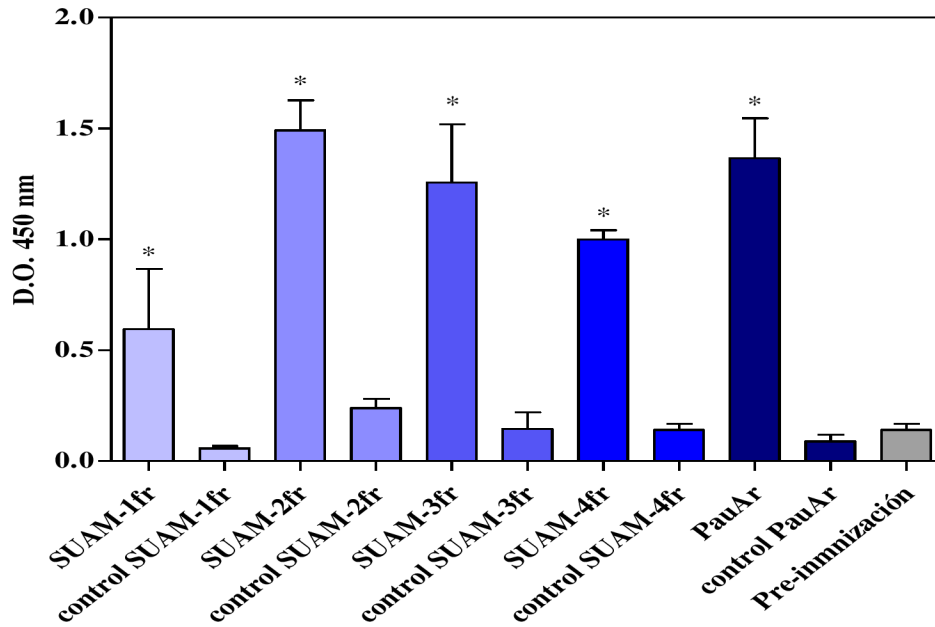


Figura.14. Determinación de los niveles de IgG mediante ensayos de ELISA, IgG específica en los animales inmunizados con las fracciones recombinantes, expresados como la D.O. obtenida para los sueros en dilución 1:100. Se muestran las medias y desviación estándar para cada grupo. (*) $p < 0,0001$ respecto al grupo control; Test Mann Whitney. El valor de los sueros pre-inmunes representa la media de todos los ensayos realizado.

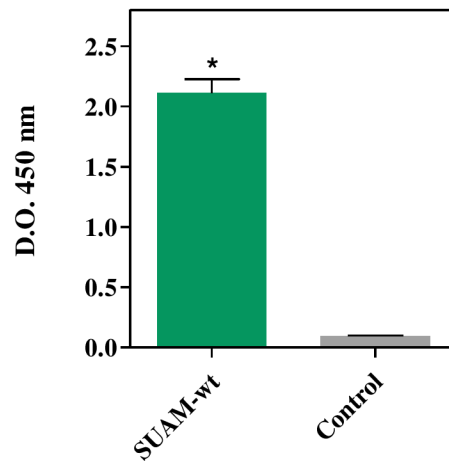


Figura.15. Determinación de los niveles de IgG anti-SUAMwt mediante ensayos de ELISA. IgG específica en los animales inmunizados con proteína SUAMwt, expresados como la D.O. obtenida para los sueros en dilución 1:100 Se muestran las medias y desviación estándar para cada grupo. (*) $p < 0,0001$; Test Mann Whitney

III.4.4.2 Determinación del título de anticuerpos

El título de anticuerpos es una medida semicuantitativa de la concentración de anticuerpos específicos que generaron los animales y permite hacer una comparación cuantitativa entre ellos. El título de IgG se determinó mediante técnica de ELISA indirecto (ver Mat y Met, inciso 3.3.2.2). El análisis realizado en los sueros mostró un título medio de $1,67 \times 10^6$ para SUAM-1fr, $5,48 \times 10^6$ para SUAM-2fr, $1,92 \times 10^6$ para SUAM-3fr, $4,5 \times 10^6$ para SUAM-4fr y $4,7 \times 10^6$ para PauAr (Figura 16). Si bien el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los animales inmunizados con las diferentes proteínas, SUAM-2fr, SUAM-4fr y PauAr mostraron una tendencia a inducir mayores títulos que SUAM-1fr y SUAM-3fr.

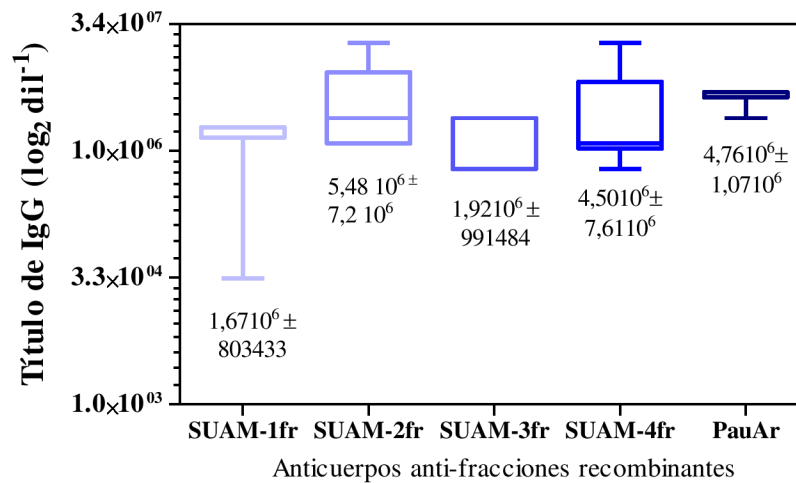


Figura.16. Títulos de anticuerpos obtenidos luego de la inmunización murina con las diferentes proteínas recombinantes. Se representa la media de los títulos obtenidos para cada grupo y el máximo y mínimo de los títulos de cada uno de los grupos. No se observan diferencias significativas entre los grupos ($p > 0,05$; Kruskal Wallis, post test Dunn).

III.4.5 Determinación de especificidad de anticuerpos anti-SUAM y anti PauAr

III.4.5.1 Ensayo de inmunodetección por Western Blot

La capacidad de los anticuerpos generados y evaluados en el ensayo 4.4.1 de reconocer tanto al antígeno wild type purificado como al inmunógeno recombinante correspondiente fue evaluada. Para ello se diseñó un ensayo de Western Blot. Brevemente, se enfrentó una mezcla de sueros de cada grupo de ratones inmunizados y controles con las proteínas a evaluar electrotransferidas previamente a una membrana de nitrocelulosa (ver Mat y Met inciso 3.4.1).

Los sueros de tres de los grupos inmunizados con las diferentes fracciones de SUAM (SUAM-1fr, SUAM-2fr y SUAM-4fr) recombinantes reconocieron a la proteína wild type, determinado por una única banda a la altura de 112 KDa (Figura 17 A, B y D). En cuanto a los anticuerpos inducidos por la proteína SUAM-3fr, se observó una inmunomarcación tenue a la altura de 112 KDa, además de otras bandas de menor peso molecular que no se observaron en la corrida electroforética de SUAMwt. Si bien algunas de estas bandas coincidieron con bandas presentes en la proteína recombinante, se excluye que estas bandas pertenezcan a trazas de proteínas recombinantes que se derramaran de una calle otra durante la corrida, debido a que las muestras se sembraron calle de por medio (Figuras 17 C). Los sueros de todos los animales inmunizados con las proteínas recombinantes, reconocieron dichos antígenos a la altura del peso molecular correspondiente y un patrón de bandas de menor peso molecular (Figura 17 A, B, C y D). No se observó ningún tipo de reconocimiento en las membranas incubadas con mezclas de sueros de animales controles.

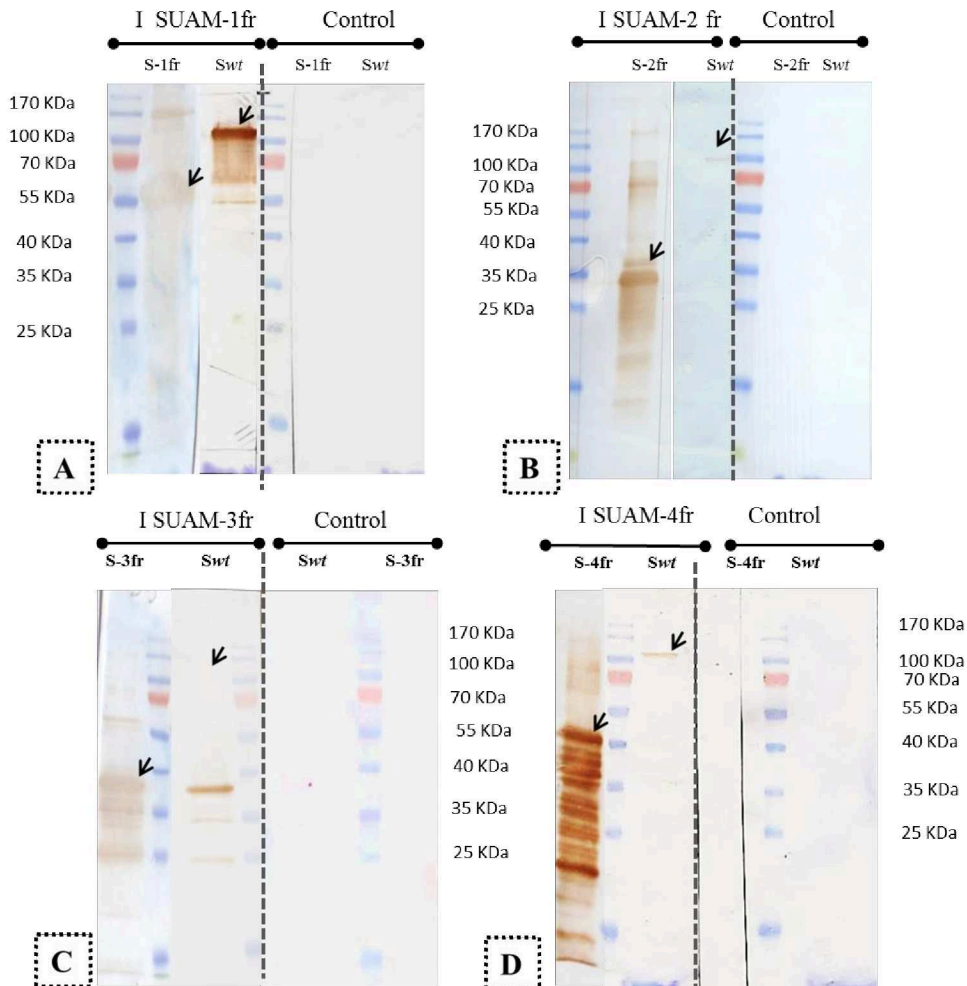


Figura.17. Inmunodetección mediante Western Blot para determinación de especificidad de anticuerpos generados por las fracciones recombinantes de SUAM contra SUAMwt. **A:** Inmunodetección con anticuerpos anti-SUAM-1fr (I SUAM-1fr) y sueros obtenidos de ratones inoculados con adyuvante sin proteínas (Controles), hacia los antígenos S-1fr: SUAM-1fr y Swt: proteína SUAMwt de SU42. **B:** inmunodetección con anticuerpos anti-SUAM-2fr (I SUAM-2fr) y sueros controles (Controles), hacia los antígenos S-2fr: SUAM-2fr y Swt. **C:** inmunodetección con anticuerpos anti-SUAM-3fr (I SUAM-3fr) y sueros controles (Controles), hacia los antígenos S-3fr: SUAM-3fr y Swt. **D:** inmunodetección con anticuerpos anti-SUAM-4fr (I SUAM-2fr) y sueros controles (Controles), hacia los antígenos S-4fr: SUAM-4fr y Swt. Flechas negras, indican la banda de interés. Marcador de peso molecular preteñido: Thermo Scientific®

Debido a la detección de proteínas de peso molecular inferior al de las proteínas recombinantes evaluadas, se realizaron controles adicionales, también por Western Blot. Estos controles consistieron en enfrentar los sueros inmunes con su respectiva proteína recombinante generadora y con un cultivo de *E. coli* BL21 lisado, correspondiente al sistema de expresión utilizado (Figura 18). Las bandas de reconocimiento entre los sueros inmunes y el lisado de *E. coli* no fueron coincidentes con la bandas observadas entre sueros inmunes y antígeno generador. En base a esto, el background observado en la Figura 17 podría deberse a fragmentos de las proteínas recombinantes y no a impurezas que no fueron eliminadas durante la purificación de las mismas

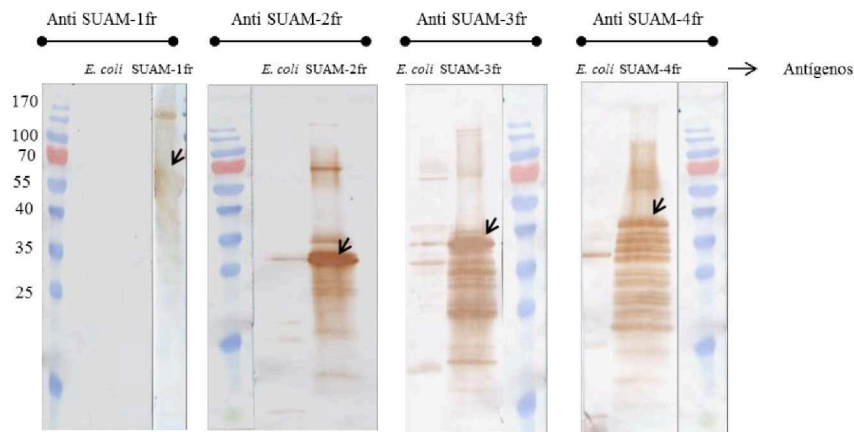


Figura.18. Inmunodetección mediante Western Blot para determinación de inespecificidad de anticuerpos. Determinaciones con los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con las diferentes fracciones de SUAMfr (anti-SUAM-fr), hacia un homogenato de *E. coli* cepa BL21 (*E. coli*) y hacia el antígeno con el cual se obtuvieron los sueros inmunes (SUAM-fr). Marcador de peso molecular pre teñido: Thermo Scientific®. Flechas negras indican el reconocimiento hacia la proteína recombinante.

La proteína recombinante PauA fue reconocida por los anticuerpos generados en los animales inmunizados (Figura 19). En cuanto al reconocimiento de la proteína wild type, los anticuerpos reconocieron una proteína de aproximadamente 35 KDa estimado para la proteína PauAwt. También se detectaron otras bandas que posiblemente correspondan a proteínas de *S. uberis* co-purificadas en el proceso de extracción de PauA. Además, los sueros del grupo control no reconocieron PauAr y ni PauAwt.

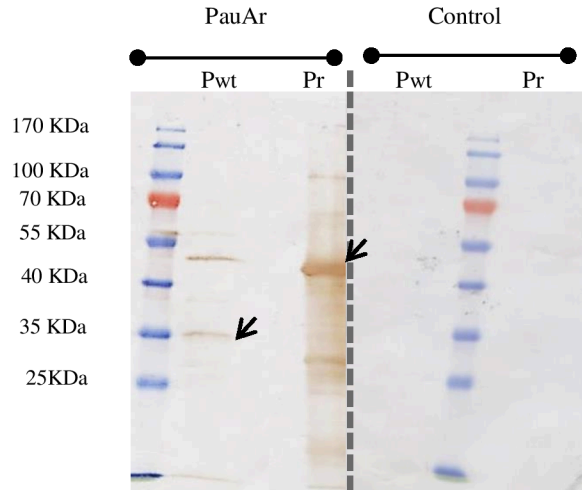


Figura.19. Evaluación de la especificidad de anticuerpos anti-PauAr. Inmunorrevelado con los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con la proteína PauAr (I PauAr) y sueros controles obtenidos de ratones inoculados con adyuvante sin proteínas (Control), hacia los antígenos PauA extraída de cepa salvaje *S. uberis* (Pwt) y PauAr (Pr). Las flechas indican las bandas de interés. Marcador de peso molecular preteñido: Thermo Scientific®.

III.4.5.2 Análisis de especificidad de anticuerpos anti-SUAM wild type, mediante ELISA

El objetivo de este experimento fue determinar si los anticuerpos anti-SUAMwt eran capaces de reconocer las diferentes fracciones recombinantes de SUAM diseñadas en este trabajo. Este ensayo nos permite analizar qué epítopes de SUAM son más antigénicos experimentalmente. Para ello se realizó un ELISA indirecto utilizando como antígeno cada una de las fracciones recombinantes y la SUAMwt extraída de un cultivo del aislamiento SU42 de *S. uberis* (Control positivo) (Figura 20).

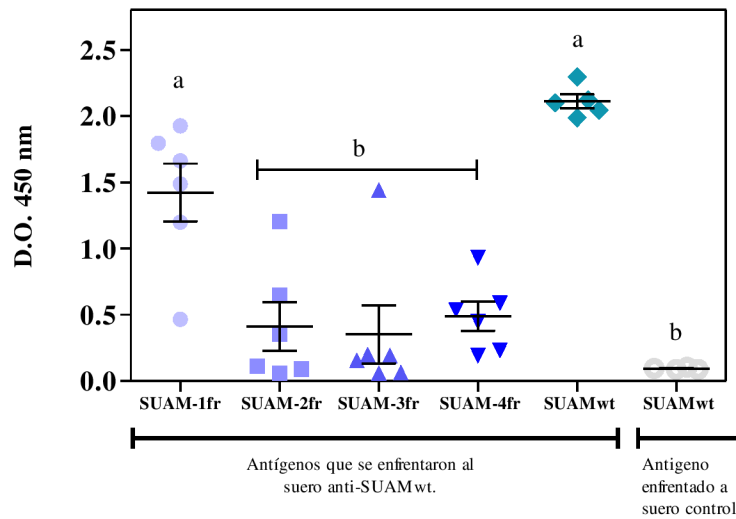


Figura. 20. Especificidad de los anticuerpos generados por SUAMwt hacia las cuatro fracciones recombinantes de SUAM. Se representa la D.O. media y desviación estándar obtenida para cada grupo. Se destacó el reconocimiento de los anticuerpos anti-SUAM-wt hacia la proteína SUAM-1fr. El reconocimiento de los anticuerpos anti- SUAMwt hacia SUAMwt (Control positivo) fue significativamente superior a los generados por SUAM-2fr, -3fr y -4fr, así como también al grupo control (Control negativo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis).

El reconocimiento que presentaron los sueros obtenidos anti-SUAMwt, hacia SUAM-1fr fue similar al observado hacia SUAMwt (Control positivo), sin observarse diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$, Test Kruskal-Wallis) (Figura 20). Por otro lado, el reconocimiento por los anticuerpos anti-SUAMwt hacia las restantes fracciones recombinantes fue menor y significativamente diferente al observado hacia SUAM-1fr y SUAMwt ($p < 0,05$; Test Kruskal-Wallis) (Figura 20). El reconocimiento de los anticuerpos de los animales controles hacia SUAMwt (Control negativo), fue significativamente menor al control positivo, destacando la especificidad de la respuesta generada ($p < 0,05$; Test Kruskal-Wallis). Estos resultados indicarían que la región de SUAM que comprende SUAM-1fr posee epítopes más inmunogénicos que el resto de las fracciones evaluadas.

III.4.5.3 Análisis de especificidad de anticuerpos anti-SUAM-fr, hacia SUAM wt, mediante ELISA

De manera inversa al ensayo anterior, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-SUAM-1fr; -2fr; -3fr y -4fr de reconocer a SUAMwt mediante ELISA indirecto. Los sueros anti-SUAMfr obtenidos al final de la inmunización se enfrentaron a placas sensibilizadas con SUAMwt (Figura 21).

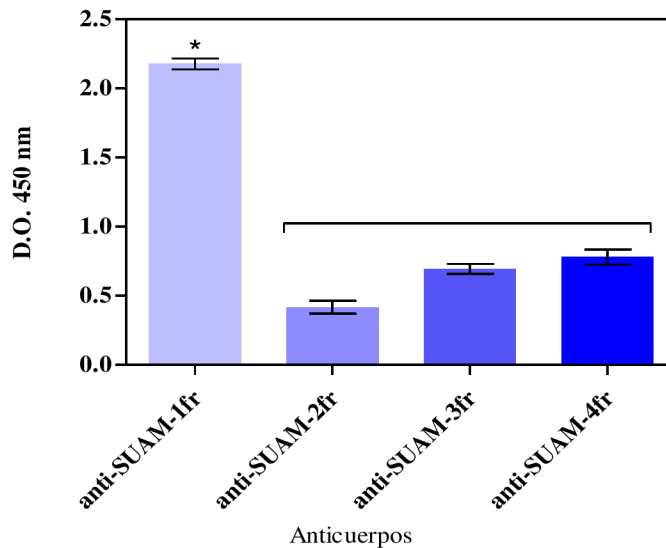


Figura. 21. Análisis de la especificidad de los anticuerpos generados por las cuatro fracciones recombinantes de SUAM hacia SUAMwt. Se representa la D.O. media y desviación estándar obtenida para cada grupo. Se destacó el reconocimiento de los anticuerpos anti-SUAM-1fr hacia la proteína SUAMwt. El reconocimiento de los anticuerpos generados por SUAM-2fr, -3fr y -4fr, fue similar entre ellos, y significativamente menor al de SUAM-1fr (*) $p < 0,05$, Test Kruskal Wallis.

Los anticuerpos anti-SUAM-1fr presentaron el mayor reconocimiento hacia SUAMwt (Figura 21). Este resultado se correlaciona con lo observado en el inmunorrevelado por Western Blot (Ensayo 4.5.1). Los anticuerpos anti-SUAM-3fr y SUAM-4fr generaron similares lecturas mediana de D.O. ($0,69 \pm 0,035$) y ($0,78 \pm 0,055$) respectivamente. Sin embargo, el ensayo de Western Blot realizado previamente (Ensayo 4.5.1) evidenció que los anticuerpos anti-SUAM-3fr reconocen

otras proteínas de *S. uberis*, indicando que parte de la lectura observada en este ensayo se debe a un reconocimiento inespecífico.

III.4.6 Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos anti-SUAM

III.4.6.1 Inhibición de la adherencia de *S. uberis* a células epiteliales mamarias

Dado que SUAM interviene en el proceso de adherencia e internalización de *S. uberis* en células epiteliales mamarias, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-SUAMfr de inhibir la adherencia, como principal medida de la funcionalidad de los anticuerpos. Los ensayos de inhibición de la adherencia en células epiteliales mamarias (MAC-T) se realizaron según lo describieron Prado y colaboradores (Prado y col., 2011). Brevemente, una suspensión de *S. uberis* (SU42) fue pre-incubada con anticuerpos dirigidos contra cada una de las 4 fracciones de SUAM o con sueros controles. Luego se realizó el ensayo de adherencia a células MAC-T, como se describió en 3.4.1.3. Se consideró 100% de adherencia al número de UFC recuperadas de bacterias opsonizadas con sueros controles (Figura 22).

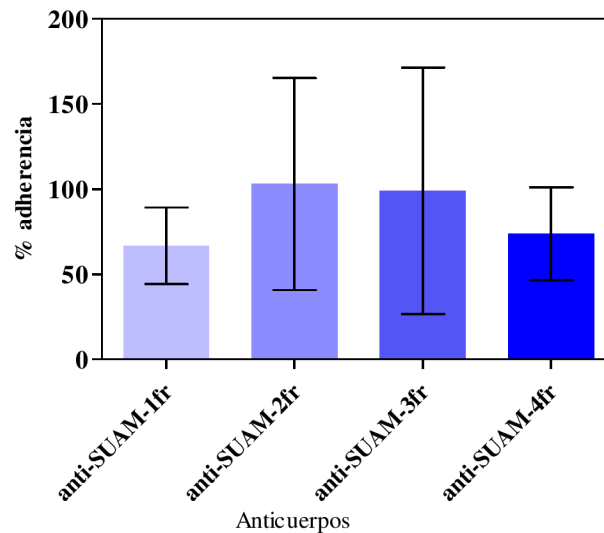


Figura.22. Ensayo de inhibición de la adherencia de *S. uberis* a células MAC-T por los anticuerpos anti-SUAMfr. Representación de la media y la DS del porcentaje de adherencia obtenido con los sueros inmunes contra las diferentes fracciones, respecto a la

adherencia con sueros controles. Las bacterias pre-incubadas con anticuerpos anti-SUAM-1fr y -4fr mostraron la mayor disminución en la adherencia a las células epiteliales (33,3% y 26,1%, respectivamente). Para los anticuerpos anti-SUAM-2fr y -3fr, la adherencia fue cercana al 100%, similar al control.

Los anticuerpos generados por SUAM-1fr y SUAM-4fr disminuyeron la adherencia un 33,3 y 26,1 %, respectivamente. Los anticuerpos generados contra SUAM-2fr y SUAM-3fr no alteraron la adherencia (103,03% y 99,06%, respectivamente). Los porcentajes de adherencia obtenidos en presencia de los anticuerpos generados por los diferentes antígenos no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$; Test Kruskal-Wallis; Figura 22).

III.4.6.2 Opsonización y Fagocitosis

Mediante un ensayo *in vitro*, se evaluó la capacidad de los anticuerpos generados por las inmunizaciones, de opsonizar a *S. uberis* y favorecer su fagocitosis por PMN y Mf murinos. Previo a las determinaciones se realizó una evaluación de la relación de bacterias (*S. uberis*-FITC) y células (PMN más Mf de peritoneo de ratón Balb/c), con el propósito de considerar la fagocitosis basal en ausencia de anticuerpos. Se trabajó con la cepa SU42 de *S. uberis*. El ensayo permitió determinar que, con una relación de bacterias:células de 10:1, se obtiene un 25% de fagocitosis basal. Las relaciones 5:1 y 20:1 mostraron valores de fagocitosis basales de un 13,3% y un 44,7% respectivamente (Figura 23). La relación de bacterias:células de 10:1 se consideró la apropiada para determinar diferencias entre la fagocitosis en presencia de los diferentes anticuerpos. La elección de este valor se debe a que es importante no sobreestimar ni subestimar el porcentaje de fagocitosis basal para poder detectar diferencias entre grupos evaluados.

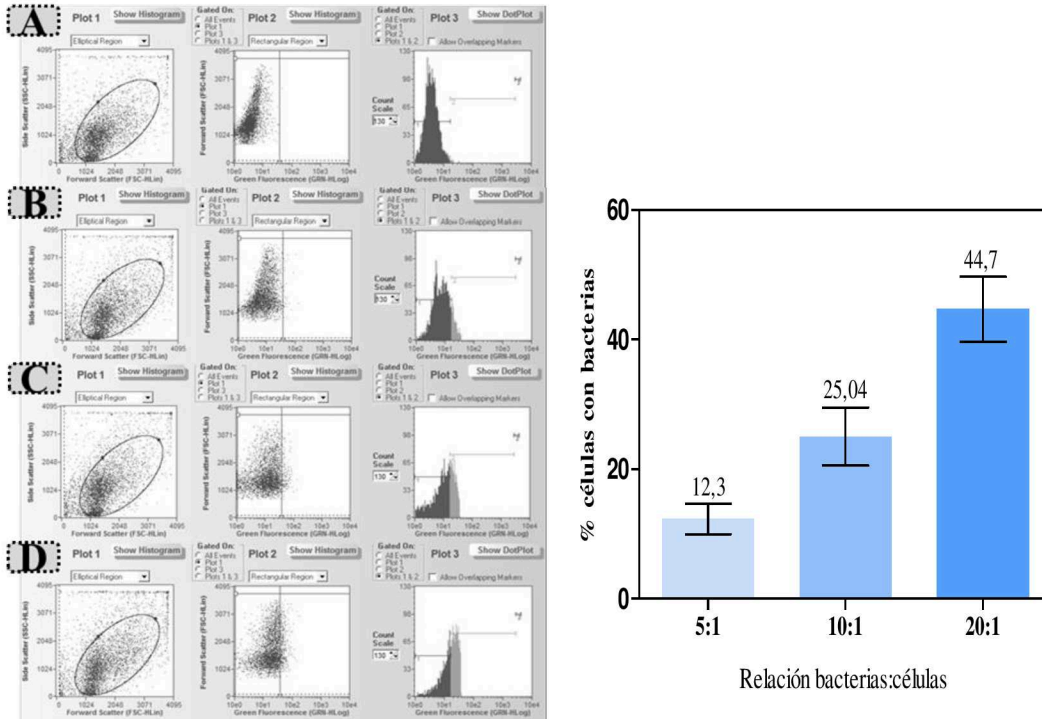


Figura.23. Fagocitosis de *S. uberis* sin anticuerpos (Fagocitosis basal). La imagen de la izquierda muestra el análisis de la citometría, en A: Polimorfo-nucleares (PMN) y macrófagos (Mf) solos, B: bacterias con FITC + (PMN + Mf) (5:1), C: bacterias con FITC + (PMN+Mf) (10:1), D: bacterias con FITC + (PMN + Mf) (20:1). La imagen de la derecha es una representación gráfica de los valores medios y desviación estándar de la fagocitosis obtenida con cada relación de bacterias:células expresada como porcentaje de células con bacterias.

La capacidad de los anticuerpos de opsonizar *S. uberis* y favorecer su fagocitosis, se determinó utilizando una mezcla de sueros de cada grupo obtenidos al finalizar la inmunización. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo. Se seleccionó la región (♦) (Figura 24 C) conteniendo a los PMN+Mf, sobre la base de los parámetros de tamaño y complejidad celular. Dentro de dicha región se realizó el análisis de incorporación de bacterias, mediante el recuento de células FITC-positivas en relación a las células totales (% de fagocitosis). Por otro lado, la intensidad media de fluorescencia (IMF), determina el número de bacterias ingeridas por célula. El porcentaje de fagocitosis y la IMF en presencia de los sueros de animales inmunizados con SUAM-1fr y SUAM-2fr mostraron una tendencia al aumento respecto a los controles. Si bien se trató de un ensayo preliminar, que

no permite ensayos estadísticos, es una tendencia a tener en cuenta. Por otro lado, los anticuerpos generados con las proteínas SUAM-3fr y SUAM-4fr mostraron valores similares a la fagocitosis basal.

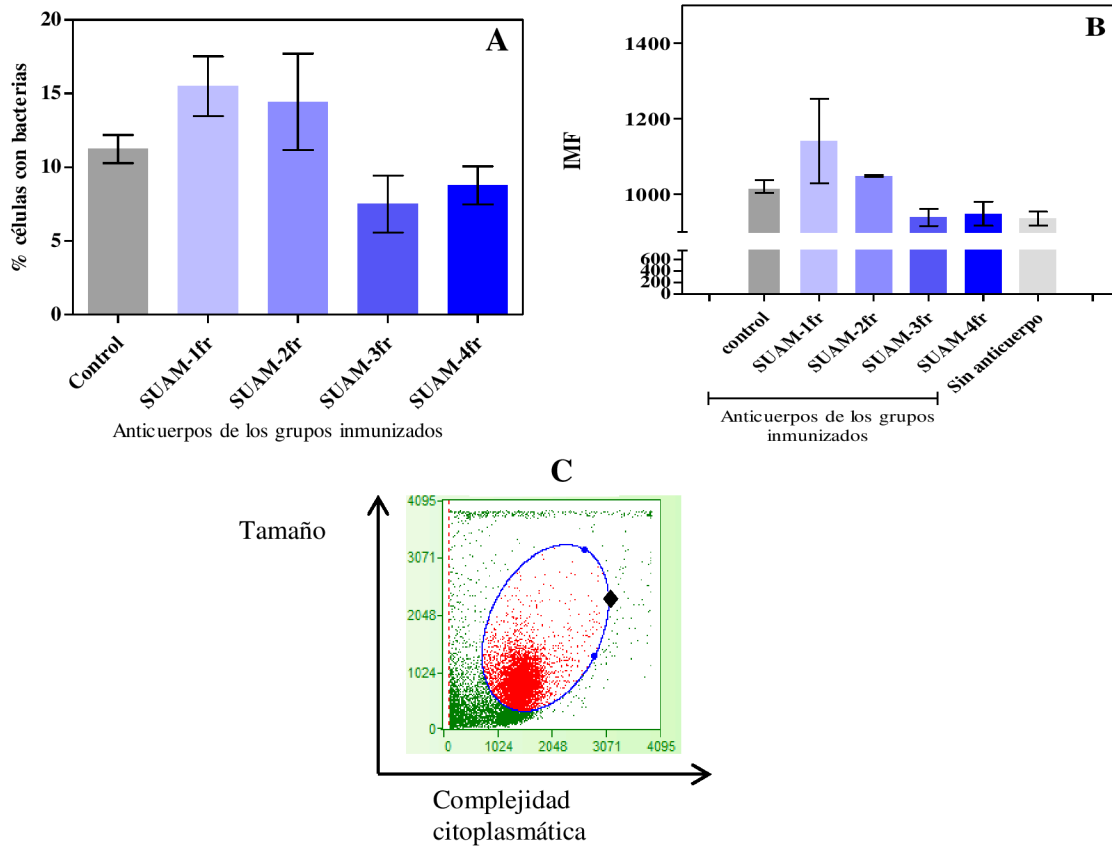


Figura.24. Ensayo de fagocitosis A: se representa la cantidad de células que fagocitaron *S. uberis* opsonizada con los diferentes anticuerpos. **B:** se observa IMF obtenida con *S. uberis* sin anticuerpo y opsonizada con los diferentes anticuerpos. **C:** se observa la región (♦) sobre la cual se midieron los parámetros mencionados.

III.4.7 Evaluación del rol de cada una de las fracciones de SUAM en la unión a lactoferrina

Se ha demostrado que SUAM media la internalización de *S. uberis* en las células epiteliales mamarias a través del receptor de lactoferrina (LF) constitutivo (Rejman y col., 1994, Patel y col., 2009). Con la finalidad de evaluar la capacidad de unión a LF de las

distintas fracciones recombinantes de SUAM se diseñó un ensayo de ELISA (inciso 3.6). La unión de las fracciones SUAM-1fr, -2fr, -3fr o -4fr recombinantes a LF se expresó como la relación porcentual, respecto a la señal obtenida para SUAMwt unida a LF (control +) considerando ésta como 100 % (Figura 25 B). Las fracciones SUAM-1fr y SUAM-4fr presentaron porcentajes de unión a LF de 8,4% y 11,2% respectivamente, mientras que las otras dos fracciones, SUAM-2fr y SUAM-3fr, se unieron un 6,1 % y 6,4 % respectivamente. Si bien el porcentaje de unión de las fracciones no presentó diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$; Test Kruskal-Wallis), los resultados sugieren que las fracciones con mayor capacidad de unión a LF serían SUAM-1fr y SUAM-4fr. La unión de SUAMwt fue significativamente superior a la de las fracciones recombinantes y a la del control negativo ($p < 0,05$; Test Kruskal Wallis (*)).

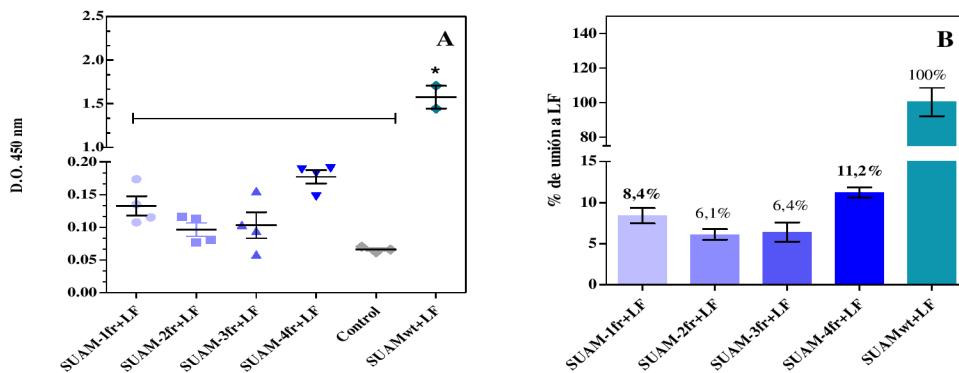


Figura.25. Prueba de unión a la lactoferrina de las distintas fracciones de SUAM mediante ELISA, en **A:** se observa la D.O.450 nm representando la unión de proteína unida a LF y reconocida por su respectivo anticuerpo. La unión de SUAMwt fue significativamente superior a la de las fracciones recombinantes y a la del control negativo (Control, sin SUAM, buffer de bloqueo) (*) $p < 0,05$; Test Kruskal Wallis. **B:** porcentaje de unión a LF de las fracciones SUAM-1fr, -2fr, -3fr o -4fr recombinantes respecto a SUAMwt (control +).

III.4.8 Evaluación de funcionalidad de anticuerpos anti-PauAr

Con el propósito de analizar la capacidad de los anticuerpos anti-PauAr de bloquear la actividad de la proteína, se optimizó previamente un ensayo que permitiera medir la actividad de PauA. Este ensayo consiste en sembrar las proteínas en pocillos realizados sobre agar-leche en presencia de plasminógeno bovino y detectar la actividad caseinolítica de la plasmina generada. Para esto, previamente se obtuvo el plasminógeno a partir de plasma bovino mediante cromatografía de afinidad a Lisina.

III.4.8.1 Extracción de plasminógeno

Luego de realizar la purificación de plasminógeno (ver Mat y Met inciso 3.7.1), los eluidos obtenidos se analizaron mediante PAGE-SDS 15% (Figura 26). En las calles 2 y 3 se observan los productos eluidos con ácido aminocaproico, en los que se obtuvieron las fracciones más enriquecidas en plasminógeno (PM: 90KDa). Se observa en estas calles una pequeña proporción de albúmina, sin embargo, la mayor proporción de ésta eluyó con la solución de lavado previa (calle 1, Figura 26). En el resto de las fracciones de elución sólo se observaron cantidades residuales de albúmina. La fracción 3 (calle3, figura 26) fue recolectada y conservada a -80°C . La concentración proteica de dicha fracción fue de 0,42 mg/ml.

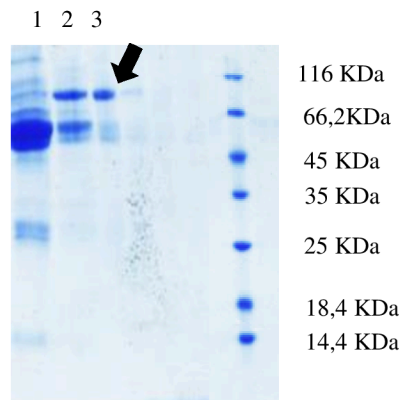


Figura.26. Purificación de Plasminógeno bovino, fracciones de elución analizadas por PAGE-SDS 15%: calle 1; se puede observar la fracción de lavado, donde se observa mayormente albúmina; en las calles 2 y 3 se aprecia el plasminógeno, indicado con flecha negra, de un peso aproximado de 90 KDa. Marcador de peso molecular BioRad.

III.4.8.2 Evaluación de actividad de PuaAr y PauAwt

El rol de PauA es activar la enzima caseinolítica plasmina, a partir de plasminógeno. En este trabajo se pretendió evaluar la capacidad de los anticuerpos, generados por PauAr en un modelo murino, de inhibir la actividad serino proteasa de PauA. En primer lugar, con la finalidad de determinar si las proteínas disponibles eran funcionalmente activas se realizó un ensayo de actividad caseinolítica. Brevemente, en una placa de agar-leche 1% se realizaron pocillos, en los cuales se sembraron las proteínas PauAwt o PauAr y plasminógeno bovino. La actividad caseinolítica se evidenció por la clarificación del agar-leche alrededor de cada pocillo (Figura 27).

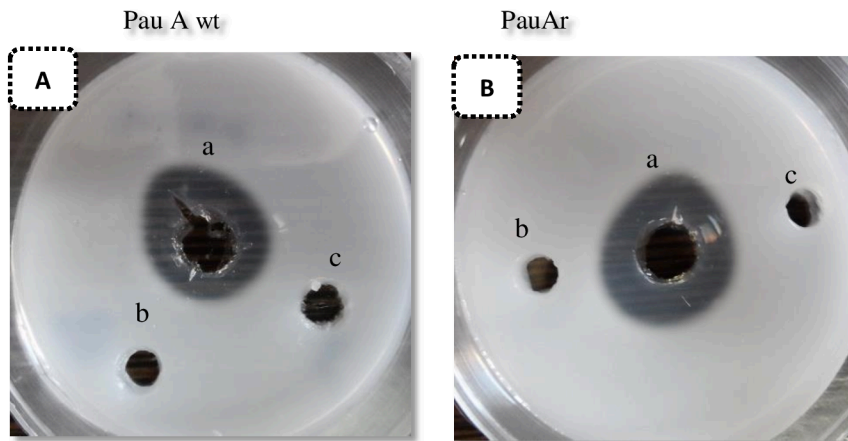


Figura 27: Ensayo de actividad caseinolítica en placa de agar leche: **A:** PauAwt + plasminógeno (a), presencia de actividad. **B:** PauAr + plasminógeno (a) presencia de actividad. Controles para ambos ensayos: (b) plasminógeno solo y (c) PauAr o PauAwt, según corresponda. Los controles no presentaron actividad caseinolítica.

Tanto PauAr como PauAwt mostraron actividad enzimática. Como controles se sembraron pocillos con cada uno de los componentes por separado, PauAwt, PauAr y plasminógeno, sin mostrar actividad en ningún caso.

III.4.8.3 Evaluación del bloqueo de actividad caseinolítica por los anticuerpos anti-PauAr

Evidenciada la actividad caseinolítica de las proteínas PauA recombinante y wild type, se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-PauAr de inhibirla. Para ello, se realizó el ensayo descrito con la variante de incubar previamente las proteínas PauAr y PauAwt con los sueros anti-PauAr. Si bien este ensayo se repitió evaluando diferentes condiciones, no se observó bloqueo de la actividad caseinolítica en ninguno de ellos (Figura 28).

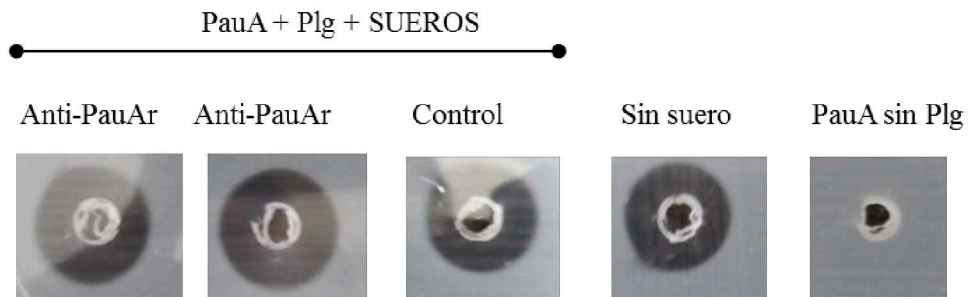


Figura.28. Bloqueo de actividad caseinolítica por medio de anticuerpos anti-PauAr. Se observa los pocillos de reacción en donde se incubó con sueros inmunes (anti-PauAr, obtenidos al final de la inmunización) ensayados por duplicado y controles (animales inmunizados con adyuvante sin antígeno). La mezcla de PauAr+Plg en ausencia de anticuerpo y PauAr en ausencia de Plg.

III.5 DISCUSIÓN

La obtención y evaluación de candidatos para el diseño de una vacuna fue el objetivo central de este capítulo, en vistas de su incorporación en una posterior formulación multicomponente. Las moléculas seleccionadas como potenciales candidatos a incorporar en preparaciones inmunogénicas contra *S. uberis* fueron SUAM, que interviene en las etapas de adherencia e invasión, y PauA, que interviene en la etapa de infección en la cual se produce la colonización de los tejidos y contribuye a la supervivencia de la bacteria. El hecho de que estos factores de virulencia tengan un rol central en el establecimiento de la infección por *S. uberis* permite inferir que los anticuerpos dirigidos contra los mismos podrían disminuir la incidencia de infecciones por esta bacteria. Estas dos moléculas han sido evaluadas anteriormente como inmunógenos individualmente, y mostraron un buen desempeño, resultando en la inducción de altos niveles de anticuerpos específicos (Finch y col., 1994, Leigh 2002, Prado y col., 2011).

Las dificultades que acarrearán la expresión y producción de proteínas recombinantes de gran tamaño fueron los motivos por los cuales se optó por trabajar con fracciones de SUAM (PM:112 KDa). La selección de la fracción a incorporar en el prototipo vacunal se basó en estudios funcionales de cada una de ellas y de los anticuerpos que las mismas generaron. Estos ensayos comprendieron, estudios de funcionalidad de anticuerpos y estudios de unión a lactoferrina, mecanismo propuesto para el ingreso de *S. uberis* a la célula epitelial (Fang y col., 2000, Patel y col., 2009). El hallazgo de una región que sea representativa de la proteína completa y que permita inducir anticuerpos que permitan bloquear la unión LF - *S. uberis* - célula epitelial, es un blanco en el diseño de vacunas contra *S. uberis*, que brindaría mayor eficacia.

En el Capítulo II se describió que tanto PauA como SUAM no sólo están presentes en la mayoría de los aislamientos de Argentina sino que son antígenos con secuencias muy conservadas independientemente del origen geográfico y epidemiológico (ver capítulo II inciso II.4.3). Esto es de importancia ya que para el diseño racional de vacunas es primordial incluir antígenos con secuencias conservadas (Nabel 2013). En los últimos años el diseño de vacunas basado en epítopes es un método conceptualmente atractivo. Esta

tecnología presenta el riesgo de que los inmunógenos no induzcan respuestas de anticuerpos protectores contra epítopes estructurales (Correia y col., 2014). La utilización de programas informáticos permite la identificación de sitios antigénicos de las proteínas, ya sea para el desarrollo de vacunas, así como de pruebas de inmunodiagnóstico y producción de anticuerpos. Siguiendo esta línea y con el propósito de encontrar una región que contenga mayores sitios probablemente inmunogénicos en la molécula SUAM, se utilizaron dos programas informáticos para la identificación de epítopes B: ABCpred y AAPPred. Estos programas fueron previamente caracterizados como los que mejor correlación mostraron entre los epítopes probables y los epítopes verdaderos (Costa y col., 2013). Esto permite seleccionar epítopes destinados al diseño de una vacuna con una mayor confianza, basándose en los datos arrojados por los algoritmos. En este trabajo los epítopes potenciales se encontraron distribuidos en forma homogénea a lo largo de la secuencia, sin identificarse una única región enriquecida en péptidos antigénicos sobre la secuencia aminoacídica de SUAM (ver inciso III.4.1 y ANEXO 2). Estos resultados están en línea con lo observado en un estudio previo sobre predicción de epítopes en SUAM (Almeida y col., 2011), en el cual se identificaron cinco péptidos de 15 aminoácidos, distribuidos a lo largo de la secuencia, que fueron seleccionados sobre la base de la hidrofobicidad de los aminoácidos y la flexibilidad de hojas beta. Sin embargo, en nuestro estudio se realizó un análisis más exhaustivo, dado que los programas informáticos tienen en cuenta distintos parámetros, que le confieren mayor sensibilidad a los predictores, la cual es una característica deseada. En función de los resultados obtenidos con los predictores sobre la molécula SUAM, se decidió clonar cinco regiones que cubrieran la mayor parte de la secuencia codificante de la molécula. Si bien una forma de diseño racional de vacuna es la utilización del antígeno entero esto no necesariamente aseguraría la obtención de un inmunógeno eficaz (Nabel 2013). Por lo tanto, la utilización de antígenos fraccionados puede ser de utilidad, si se encuentra la región apropiada funcionalmente y se logra potenciar la respuesta con adyuvantes de última generación.

Respecto a PauA, previamente se estudiaron probables epítopes utilizando una biblioteca de decapeptidos analizando toda la secuencia por ensayo de competición entre anticuerpos monoclonales y anticuerpos anti-PauA de animales infectados. De este modo se

encontró una región antigénica asociada al dominio beta (Mcvey y col., 2005). Si bien no se conoce la implicancia de este dominio en la funcionalidad de la proteína, podría ser blanco para vacunas (Mcvey y col., 2005). Por otro lado, se identificó mediante modelado molecular que entre la Leucina 69 y la Glutamina 71 se encuentra la región que interactúa con el plasminógeno (Ward y col., 2004a), constituyendo un posible sitio de bloqueo por parte de anticuerpos. En resumen, debido a que no se ha identificado una región de mayor importancia teniendo en cuenta epítopes probables y función, se propuso utilizar la proteína entera y no una fracción en particular.

Los antígenos a evaluar fueron clonados en el sistema de expresión en *E. coli* utilizando el vector pET32a. Este sistema permitió obtener 4 fracciones de SUAM y PauA en forma recombinantes. La fracción SUAM-5fr no se logró clonar, a pesar de que se realizaron pruebas bajo diferentes condiciones de transformación. Entre ellas, variaciones en el paso de ligación, favoreciéndola mediante la utilización de PEG (Hayashi y col., 1986). También se probó clonar el fragmento utilizando el sistema del vector pGEM®-T Easy. Sin embargo, las estrategias ensayadas no permitieron alcanzar el clonado exitoso de la secuencia de interés. Esta dificultad, llevó a descartar esta fracción en la evaluación de este trabajo. Los clones fueron obtenidos en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, que se caracteriza por ser una cepa deficiente en la expresión de proteasas lonA y ompT, esto permite disminuir la degradación proteolítica de los productos recombinantes (García y col., 2013). El sistema de expresión en *E. coli* es uno de los más eficaces y utilizados para la expresión de proteínas recombinantes (Chen 2012, Huang y col., 2012). En el sistema pET32a, el gen insertado se encuentra bajo el control del promotor T7/lac, permitiendo que la transcripción permanezca reprimida hasta el momento de inducción mediante IPTG. El sistema de expresión permite obtener las proteínas fusionadas a una proteína denominada tioredoxina (TRX). El análisis realizado sobre la probabilidad de ser expresadas en forma soluble en *E. coli* según el estudio sobre las secuencias de interés a través de <http://biotech.ou.edu/>, mostró un alto porcentaje de insolubilidad, para todas las proteínas (datos no mostrados). A pesar de esta predicción, se logró expresar dos de las proteínas en forma soluble, posiblemente debido a la ventaja que le confiere estar fusionada a TRX. Está caracterizado que la fusión de la TRX al extremo N- o C-terminal de la proteína

recombinante de interés le confiere la posibilidad de aumentar su expresión soluble en el citoplasma de *E. coli* (Zhou y col., 2006) y mayor estabilidad térmica. El sistema de expresión utilizado (pET32a), genera en las proteínas recombinantes un dominio de oligohistidina (His•Tag[®]) fusionado a la región tanto N- como C-terminal de la proteína. Esta característica permite la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de pseudoafinidad, al poder coordinarse con cationes divalentes como el Ni²⁺ inmovilizados sobre una resina de quelación metálica. Este sistema de purificación por pseudoafinidad es el más utilizado y permite obtener elevados niveles de pureza empleando un solo paso cromatográfico (Rosano y col., 2014). Por otro lado, se ha descrito que la inmunogenicidad del antígeno es mejorada cuando las proteínas de interés se encontraran fusionadas a TRX (Valiente-Gabioud y col., 2011). El rendimiento para este sistema de expresión es una ventaja frente a otros sistemas habiéndose descrito rendimientos de 8,5 g/l (Yin y col., 2007) y 2,5-25 mg/l de cultivo (Molaei y col., 2013, Piubelli y col., 2013). En este trabajo los niveles de producción fueron entre 14-150 mg/l de cultivo, este resultado está en línea con los registros bibliográficos.

Tanto SUAM como PauA fueron previamente clonadas y purificadas por otros grupos. En el caso de PauA, se realizó con la finalidad de evaluar su secuencia aminoacídica (Johnsen y col., 1999). Sin embargo, su utilización como inmunógeno no fue reportada, ya que las inmunizaciones experimentales fueron realizadas en bovinos con la proteína extraída del sobrenadante de cultivo (Leigh y col., 1999) o con el microorganismo muerto entero (Finch y col., 1994). En este trabajo se evaluó a PauAr como inmunógeno en un modelo murino como paso preliminar para su destino a inmunización de bovinos. Una de las ventajas que brinda la utilización de antígenos recombinantes purificados utilizados en terapia inmunoproláctica es anular el riesgo de infección después de la vacunación, que pueden provocar las inmunizaciones con microorganismos inactivados (Jarzab y col., 2013). En comparación a la utilización de un extracto conteniendo la proteína wt, como vacuna, la utilización de proteínas recombinantes disminuye los costos de producción dados los altos rendimientos que se pueden lograr con los sistemas de expresión. En el caso de SUAM, fue previamente clonada entera y utilizada para inmunizar bovinos y evaluar su eficiencia como inmunógeno (Prado y col., 2011). Una de las ventajas que posee la

utilización de una fracción funcional, sobre la utilización de la molécula entera, es la posibilidad de enfocar la respuesta inmune hacia una determinada región. Se ha reportado para varios patógenos como *Streptococcus* del grupo B, *Clostridium difficile*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium falciparum*, y *Trypanosoma cruzi*, que los antígenos de gran tamaño presentan epítopes no protectivos inmunodominantes, que “distraen” al sistema inmunológico de los epítopes protectivos como una forma de evasión (Covacci y col., 1993). Por otra parte, teniendo en cuenta el gran tamaño de la proteína completa, la obtención de productos recombinantes de menor peso molecular también representa una ventaja operativa.

Resultados previos obtenidos en el Laboratorio de Tecnología Inmunológica mostraron que la inoculación de 2 µg o 20 µg de antígeno proteico recombinante generaba respuestas similares de anticuerpos (Pujato y col., 2011). En base a este trabajo se optó por utilizar la menor cantidad de antígeno, opción ventajosa sobre todo a la hora de combinarlo en una vacuna multicomponente. La respuesta inmune obtenida en el modelo murino con los diferentes antígenos, mostró que poseen capacidad inmunogénica, generando una respuesta humoral específica. Todas las fracciones de SUAM generaron una respuesta humoral a pesar de ser fracciones de una proteína y no una proteína entera. Esto está en línea con la observación de que antígenos proteicos enteros no son necesariamente esenciales para la inducción de la inmunidad y que los epítopes protectores deben ser suficientes para inducir respuestas inmunes y proporcionar protección contra los patógenos (Thomas y col., 2013).

La obtención de las proteínas wt es de importancia para la evaluación de la capacidad que tienen los anticuerpos generados por las proteínas recombinantes de reconocer la proteína original del microorganismo. La extracción de SUAM se realizó previamente y se determinó que el método de extracción con SDS fue más eficiente que la extracción con mutanolisina (Almeida y col., 2006a). La aplicación de esta metodología permitió obtener una cantidad de antígeno detectable y con una alta pureza (inciso III.4.3). La técnica de recuperación de proteínas de sobrenadante para obtener PauA permitió obtener el antígeno en una baja cantidad y acompañado de otras proteínas co-purificadas (inciso III.4.3). Este

resultado fue concordante con lo descrito en trabajos previos (Egan y col., 2010). Además, fue evaluada otra técnica basada en la precipitación con Sulfato de Amonio, previamente reportada para extracción de proteínas de sobrenadante (Leigh y col., 1999), con la cual no se logró mejorar la extracción obtenida (datos no mostrados). Para ambas proteínas no se han descrito las condiciones de máxima expresión, este es un inconveniente que se ve reflejado en la obtención de PauA, en la cual no se obtiene un extracto enriquecido en la proteína de interés. Una estrategia para enriquecer la extracción de PauA es utilizando una segunda purificación mediante cromatografía de afinidad a plasminógeno como se ha reportado para la estreptoquinasa de *Streptococcus equisimilis* (Babashamsi y col., 2009).

El inconveniente de utilizar proteínas recombinantes fusionadas a otras moléculas para ensayos de inmunización, es la generación de anticuerpos específicos contra la proteína de fusión, en este caso TRX. En consecuencia, se realizaron ensayos de inmunodetección para verificar la especificidad de los sueros obtenidos hacia las proteínas wild type de *S. uberis*. El reconocimiento de los anticuerpos generados con las diferentes fracciones recombinantes de SUAM hacia SUAMwt, demostró que los anticuerpos son específicos (ver inciso III.5.3). Más aún, se evidenció que los anticuerpos generados en los ratones inmunizados con SUAMwt presentaron especificidad contra las distintas fracciones de SUAM (ver inciso III.5.2) a pesar de la presencia de TRX, indicando que no hay impedimento estructural por la proteína de fusión. Mediante Western Blot y ELISA se observó que los anticuerpos anti-SUAMwt tuvieron un reconocimiento similar hacia SUAM-1fr y hacia SUAMwt (inciso III.4.5.1 Figura 17 e inciso III.4.5.2). También se observó que los anticuerpos generados por SUAM-1fr mostraron un reconocimiento significativamente superior hacia SUAMwt al generado por las demás fracciones de SUAM. Este resultado muestra una propiedad distintiva de SUAM-1fr sobre las otras fracciones, que permitiría elegirla como uno de los potenciales componentes vacunales contra *S. uberis*. De la misma manera, se realizó inmunodetección con los anticuerpos anti-PauAr, los cuales presentaron un reconocimiento escaso hacia la proteína PauAw, de un peso aproximado de 35KDa (ver inciso III.4.5.1 Figura 19). Además se observó un reconocimiento hacia bandas pertenecientes a otras proteínas que presentaba el extracto de *S. uberis*, que fueron observadas también por PAGE-SDS. El activador de plasminógeno

está codificado por una secuencia de 286 aa con un peso aproximado de 33,4 KDa, aunque se han reportado pesos de entre 29 y 33,4 KDa (Leigh 1994, Johnsen y col., 1999, Rosey y col., 1999). El hecho de no conocer las condiciones que permitan expresar la proteína de interés en mayor cantidad, o disponer de un anticuerpo monoclonal que nos permita asegurar que la banda de 35 KDa pertenece a PauA de *S. uberis* es un inconveniente en la identificación correcta por inmunodetección.

Debido a que para todos los antígenos se observaron, tanto en los análisis de SDS-PAGE como en los ensayos de inmunodetección, bandas de peso molecular inferior al del antígeno en cuestión, se corroboró si estas bandas correspondían a proteínas co-purificadas de la bacteria productora *E. coli*. De ser así, esto sesgaría los resultados de funcionalidad futuros. Por lo tanto, se realizó un ensayo de inmunodetección hacia un homogenato de *E. coli* (ver inciso III.4.5.1 Figura 18). En todos los anticuerpos se observó un escaso reconocimiento de proteínas pertenecientes al sistema de expresión, de un peso molecular que no coincide con el patrón de bandas observadas frente al antígeno de interés, lo que sugiere que esas bandas pertenecen a degradación de los antígenos en el tiempo y se debería optimizar la conservación de los mismos. La presencia de bandas inespecíficas en el reconocimiento hacia las proteínas wt que se observó en los casos de anticuerpos anti-SUAM-3fr y -PauAr, podría deberse a un reconocimiento cruzado hacia otras proteínas de *S. uberis*.

Cabe destacar que para el clonado de las fracciones se partió de la cepa SU05 mientras que para la evaluación de especificidad y funcionalidad se utilizó una cepa diferente (SU42). Este detalle técnico resulta de gran importancia dado que se pudo comprobar que los anticuerpos generados por una cepa son capaces de reconocer a las proteínas de una cepa heteróloga. Previamente, se reportó que una causa posible de la escasa eficacia en vacunas a microorganismo muerto de *S. uberis* es la falta de protección al desafiar con una cepa heteróloga. Los autores han argumentado que la diversidad genética que presenta dicha bacteria es la causa de este impedimento (Finch y col., 1994). Sin embargo, en este trabajo de Tesis se ha demostrado que los genes *sua* y *pauA* no solamente se encuentran en la mayoría de los aislamientos sino que son altamente conservados en su secuencia nucleotídica y aminoacídica. Para ampliar su espectro de protección, se propuso

incorporar a estos dos factores de virulencia conservados como componentes de una vacuna a subunidades.

Se ha demostrado que SUAM media la internalización de *S. uberis* a las células epiteliales mamarias a través del receptor de lactoferrina (LF) constitutivo (Rejman y col., 1994, Patel y col., 2009). El bloqueo o prevención de esta unión puede reducir la capacidad de *S. uberis* de colonizar la glándula mamaria. Al respecto, Chen y colaboradores demostraron que la delección del gen *sua* de *S. uberis* redujo marcadamente la capacidad de adherencia e internalización de la bacteria en células epiteliales mamarias (Chen y col., 2011). En este trabajo se observó que dos fracciones (SUAM-1fr y SUAM-4fr) tenían capacidad de disminuir la adherencia, en aproximadamente un 30% (ver inciso III.4.6.1). Se ha reportado que la inhibición de la adherencia a través de SUAM puede no ser completa dado que *S. uberis* posee otros mecanismos que median su ingreso a las células epiteliales mamarias (Almeida y col., 1999).

La proteína LF posee capacidad bactericida y bacteriostática, a través de una acción quelante de iones y unión a la superficie de microorganismos, así también se ha descrito que posee varias funciones: antifúngicas, antivirales e inmunomoduladoras (Van Der Strate y col., 2001, Berlutti y col., 2011). También se ha reportado un aumento en la cantidad de LF presente en las IIM tanto clínicas como subclínicas (Harmon y col., 1976, Kawai y col., 1999). En el caso particular de *S. uberis* se reportó que induce la secreción de LF (Chaneton y col., 2008). *S. uberis* evolucionó para evadir esta acción bactericida contando con una ventaja selectiva frente a otros microorganismos que son susceptibles a la acción de LF, como *S. aureus* y *E. coli* (Chaneton y col., 2008). La entrada de *S. uberis* a la célula epitelial está mediada por la unión a LF. A pesar de describirse como un mecanismo patogénico, no se ha identificado sobre SUAM algún sitio que esté relacionado con la unión a LF. Es de importancia reconocer el probable sitio de unión a LF en SUAM ya que permitiría focalizar la respuesta inmune para bloquear su función. En este sentido, se observó que las SUAM-1fr y SUAM-4fr mostraron una tendencia a unirse en mayor proporción a la LF (ver inciso III.4.7). Si bien no se observaron diferencias significativas, estos resultados están en concordancia con lo observado en la inhibición de la adherencia,

donde los anticuerpos contra esas mismas fracciones son los que disminuyeron la adherencia del microorganismo. Previamente, otros trabajos han utilizado las proteínas de unión a lactoferrina como blanco de candidatos de vacunas tales como LBPA y LBPB de *Moraxella catarrhalis* (Mcmichael 2000) y LBPA y LBPB de *Neisseria meningitidis* (Pettersson y col., 2006). Dado que no se conoce de qué forma puede afectar la presencia de TRX la unión entre LF y SUAM, sería necesario realizar el ensayo en ausencia de la proteína de fusión.

Los macrófagos (Mf), así como los leucocitos polimorfonucleares (PMN), son células predominantes en la leche y secreción de vacas en período seco donde ocurren las mayores infecciones por *S. uberis* y son una defensa importante contra las infecciones (Almeida y col., 1993). Previamente, se reportó que la actividad fagocítica de los macrófagos bovinos puede ser incrementada con la presencia de anticuerpos opsónicos (Ezzat Alnakip y col., 2014). Si bien los neutrófilos constituyen una defensa importante en la glándula en lactación, se observó que *S. uberis* secreta proteínas o factores que pueden inhibir la fagocitosis, por lo cual su eficacia en la protección contra infecciones es cuestionada (Pedersen y col., 2003). Sin embargo, es de importancia evaluar la capacidad fagocítica mediada por anticuerpos, y utilizarla como criterio de selección de una de las fracciones de SUAM. En ese sentido se evaluó si los anticuerpos generados por alguna de las fracciones recombinantes de SUAM presentaban mayor capacidad opsónica. Los anticuerpos obtenidos por inmunización con las fracciones SUAM-1fr y SUAM-2fr mostraron una tendencia a promover la fagocitosis de *S. uberis* por PMN y Mf (ver inciso III.4.6.2). Si bien sería necesario aumentar el número de determinaciones se observaron las mismas tendencias en dos ensayos independientes.

El análisis de funcionalidad realizado sobre PauAr requirió previamente la obtención del plasminógeno bovino, para lo cual se siguió la técnica descrita previamente para extracción de plasminógeno humano (Deutsch y col., 1970), y que había resultado eficiente para ambos (Cañas Bermudez. O y col., 2006). La técnica empleada permitió obtener una suficiente cantidad de plasminógeno, a partir de plasma bovino. La funcionalidad de PauAr y PauAwt se vio reflejado a través de la capacidad caseinolítica de la plasmina generada a

partir de estas proteínas (ver inciso III.4.8.2). Tener una proteína recombinante funcionalmente activa es importante porque indica que su sitio activo está conservado estructuralmente y potencialmente podría generar anticuerpos dirigidos contra el mismo. Sin embargo, no fue posible demostrar la capacidad inhibitoria funcional de los anticuerpos anti-PauAr obtenidos en ratón (ver inciso III.4.8.3). Si bien esto puede atribuirse a que no se generaron anticuerpos neutralizantes, se deberá descartar una deficiencia de la metodología empleada. Por este motivo, en otros trabajos se utilizó una técnica cuantitativa para medir la conversión de plasminógeno a plasmina mediante una reacción colorimétrica (Leigh y col., 1998). Por otra parte, se describió que una molécula de PauA mutante, la cual pierde su actividad enzimática, conserva su capacidad virulenta (Ward y col., 2003). Esto indicaría que la capacidad de inhibir la actividad caseinolítica de los anticuerpos no necesariamente indica que estos sean protectivos.

III.6 CONCLUSIONES PARCIALES

En esta etapa del trabajo se optimizó la obtención de 5 proteínas recombinantes que forman parte de factores de virulencia de relevancia para la infección intramamaria causada por *S. uberis*. Antígenos purificados y estables son indispensables para su evaluación en ensayos biológicos.

La funcionalidad de la proteína SUAM pudo ser evaluada en este trabajo. El estudio de las fracciones antigénicas de esta proteína permitió sugerir qué regiones intervienen en la unión a LF y cuál de ellas interviene en el proceso de internalización de la *S. uberis*. Esta información se destaca no sólo en el entendimiento del mecanismo funcional de este factor de virulencia sino también en la búsqueda de un blanco de acción de una vacuna.

La evaluación de la capacidad de unión a LF mostró que todas las fracciones se unieron a esta proteína siendo SUAM-1fr y SUAM-4fr las que presentaron mayor porcentaje de ligación. Por otro lado, los anticuerpos generados contra SUAM-1fr presentaron el menor título. Sin embargo, estos anticuerpos mostraron una especificidad hacia la proteína wt cuantitativamente superior a las demás fracciones. Junto a los anticuerpos anti-SUAM-4fr, interfirieron en la adherencia de *S. uberis* a células epiteliales mamarias. Con la evidencia expuesta en estos resultados se podría pensar que, las regiones de SUAM que comprenden SUAM-1fr y -4fr presentarían algún sitio que mediaría la unión del microorganismo a LF.

Los ensayos de fagocitosis mostraron que los anticuerpos generados por SUAM-1fr son los que mostraron mayor capacidad de mediar la fagocitosis de *S. uberis*.

La suma de resultados obtenidos permite proponer a SUAM-1fr como potencial componente de una vacuna a subunidad contra mastitis bovina por *S. uberis*.

En cuanto a PauA, se logró obtener la proteína recombinante funcionalmente activa. Los anticuerpos obtenidos demostraron la inmunogenicidad de la proteína recombinante y su capacidad de reconocer la proteína extraída de una cepa heteróloga.

Capítulo IV: Evaluación de un prototipo vacunal en bovinos.

IV.1 MARCO TEÓRICO

Si bien hoy en día no existe en el mercado una vacuna para prevenir la mastitis bovina causada por *S. uberis*, fueron varios los intentos realizados (Hill 1988, Finch y col., 1994, Leigh y col., 1999, Fontaine y col., 2002, Prado y col., 2011, Wedlock y col., 2014). La activación de la inmunidad contra mastitis por *S. uberis* fue estudiada inicialmente por Hill (Hill 1988). En ese trabajo Hill mostró que una proporción significativa del ganado infectado con *S. uberis* a través del canal del pezón, posterior a la cura de la infección, era refractaria a infecciones posteriores. La inmunización con bacterias muertas por calor o por tratamiento con formol generó buenos niveles de IgG₁, IgG₂ e IgM, y una capacidad linfoproliferativa tanto en leche como en sangre, aunque no se observó capacidad opsonica de los anticuerpos (Finch y col., 1994). Posteriormente, en otro estudio se aplicó una vacuna con el microorganismo vivo y un refuerzo intramamario con extracto de proteínas de superficie de *S. uberis*. El mismo logró una inmunidad humoral limitada que protegió a la exposición con una cepa homóloga (Finch y col., 1997). La vacunación con la molécula GapC recombinante, generó una protección significativa frente a un desafío con cepa heteróloga, indicando que los anticuerpos anti-GapC generados, podrían inhibir GapC asociada a la superficie de la bacteria invasora (Fontaine y col., 2002). Por otro lado, la inmunización con el activador de plasminógeno (PauA) wild type, extraído desde el sobrenadante de cultivo de *S. uberis* (Leigh y col., 1999), mostró una capacidad neutralizante de la actividad de PauA por los anticuerpos generados. Un trabajo centrado en la hipótesis de que la adherencia a la célula epitelial es el principal mecanismo de entrada (Almeida y col., 1996), enfocó la protección en la capacidad de generar anticuerpos que bloqueen este paso, a través de inmunización con SUAM recombinante (Prado y col., 2011). En este trabajo se obtuvieron resultados muy prometedores ya que no sólo se obtuvo una respuesta humoral significativa tanto en sangre como en leche, sino que los anticuerpos bloquearon la adherencia e internalización a la célula. Si bien la mayoría de estos trabajos focalizan en la respuesta innata y humoral, un número creciente de evidencias indican que una respuesta mediada por células en la ubre de la vaca, es parte de la protección de la glándula contra infecciones. Datos recientes muestran que la mastitis bovina está acompañada por un aumento significativo de células T en la glándula infectada, esto sugiere un potencial papel de las células T en la glándula mamaria durante la infección

(Mehrzad y col., 2008). La exposición ambiental o la infección con *S. uberis*, evidenció que las células T presentes en glándula mamaria son en su mayoría CD8⁺, y con la capacidad de matar a *S. uberis* (Denis y col., 2011). Un trabajo reciente, en el que los animales fueron inmunizados con un extracto de proteínas obtenidas de tres cepas de *S. uberis*, apunta a una respuesta celular como principal mecanismo de defensa. Los animales generaron una buena respuesta tanto celular como humoral, en particular, la vacunación generó un efecto citotóxico antígeno-específico contra los monocitos/macrófagos de sangre que habían fagocitado *S. uberis* (Wedlock y col., 2014).

En la actualidad, las vacunas tienden a estar formuladas con antígenos recombinantes purificados o sintéticos, por lo que, los disparadores naturales de la respuesta inmune tales como ácidos nucleicos, lípidos y componentes de membrana celular, no están presentes. Este tipo de vacunas resulta menos inmunogénica que una vacuna a microorganismos enteros. Esto ha llevado a la necesidad de generar adyuvantes potentes. Uno de los enfoques prometedores para mejorar la eficacia en el desarrollo de nuevas vacunas profilácticas y terapéuticas, es el uso de adyuvantes innovadores así como también la combinación de diferentes tipos de adyuvantes. Los adyuvantes suelen ser definidos por su función, la definición aceptada es que los adyuvantes son componentes agregados a las formulaciones de vacunas para aumentar la inmunogenicidad de los antígenos in vivo (Brito y col., 2014). Según sus características, los adyuvantes pueden acelerar la generación de respuestas inmunes robustas, sostener las repuestas por períodos de tiempo más prolongados, inducir respuestas locales en mucosas, generar anticuerpos con aumentada avidéz y capacidad neutralizante, desarrollar respuestas mediadas por linfocitos T citotóxicos, aumentar las respuestas en individuos con sistemas inmunes débiles, y reducir la cantidad de antígeno necesaria en las formulaciones, permitiendo disminuir los costos de los programas de vacunación (Pashine y col., 2005).

Hidróxido de aluminio

El adyuvante clásico utilizado hasta el momento tanto en vacunas humanas como veterinarias y aceptado internacionalmente por las agencias reguladoras debido a su perfil de seguridad y tolerancia son las sales de aluminio. El uso de las sales de aluminio como adyuvante fue originado en 1926 con las observaciones del grupo de trabajo de Glenn

quienes mostraron que la toxina diftérica precipitada con aluminio era más potente como inmunógeno que el antígeno solo (Glenny y col., 1925). Con los años las sales de aluminio fueron reemplazadas por geles de aluminio pre-formulados, los cuales permiten la adsorción del antígeno de interés. El mecanismo de acción propuesto por Glenny y col. es conocido como efecto depósito (depot), ya que el aluminio principalmente retiene el antígeno en el sitio de inyección, permitiendo exponerlo por mayor tiempo, conservando la estabilidad del antígeno y aumentando de esta manera la posibilidad de interactuar con las células presentadoras de antígenos reclutadas (Glenny y col., 1931). Sin embargo, estudios recientes demostraron que el efecto de depósito no es importante para el efecto adyuvante del aluminio, ya que después de la inyección intramuscular, parte del antígeno difunde lejos del sitio de inyección dentro de horas de la administración. Además, se observó que la escisión del sitio de inyección dentro de unas pocas horas después de la administración de la vacuna no redujo la magnitud de las respuestas inmunes específicas de antígeno. Sobre esta base, algunos autores descartan el papel de depósito de antígeno como modo de acción y se propone como mecanismo de acción del aluminio, la activación del complejo inflamasoma NLRP3 (De Gregorio y col., 2013). El complejo inflamasoma NLRP3 se requiere para el procesamiento de varias citoquinas pro-inflamatorias claves, incluyendo IL-1, IL-18, IL-33. El mecanismo molecular de la activación de NLRP3 no está claro, sin embargo, se ha demostrado que el aluminio luego de la internalización por la CPA desestabiliza la liberación de proteasas endosomales que son necesarias para la activación inflamasoma NLRP3 y liberación de citoquinas (Mastelic y col., 2010, De Gregorio y col., 2013). Los efectos indirectos del aluminio pueden ser inducidos a través de la liberación de ciertas moléculas, que contribuyen a su actividad adyuvante. Por ejemplo, el aluminio estimula la inducción de ácido úrico, que se produce normalmente como un patrón molecular asociado a daños (PMAD). El ácido úrico es internalizado por las CPA, que son activadas a través del inflamasoma, proporcionando así una señal inmunoestimulante secundaria, en respuesta a la inmunización con vacunas que contienen aluminio. De una manera similar, el aluminio estimula la liberación de ADN a partir de células muertas y este PMAD, parece jugar un papel en la actividad adyuvante mediante la promoción de la presentación antigénica a células T helper (Mastelic y col., 2010, De Gregorio y col., 2013).

Entre las limitantes de las sales de aluminio se encuentran su débil efecto adyuvante con ciertos antígenos vacunales y la capacidad limitada de inducir respuestas inmunes mediadas por células o respuestas de células T citotóxicas (Hogenesch 2002). El hidróxido de aluminio estimula preferentemente una respuesta de tipo Th2 (Bomford 1980, Comoy y col., 1997) lo que llevó a la necesidad de combinarlo con otros componentes para encontrar una respuesta balanceada, con este propósito se generaron combinaciones como por ejemplo, con IL-12, con γ -inulina y con oligonucleótidos con motivos GpC no metilados (Hogenesch 2002). Dada la seguridad general de hidróxido de aluminio, combinaciones que mejoren su eficacia pueden ser claves en las vacunas en el futuro. Actualmente, se encuentran licenciados adyuvantes de segunda generación a base de aluminio, como es el AS04, incluido en la vacuna de la hepatitis B (Garcon y col., 2011), donde el aluminio es co-adsorbido con monofosforil lípido A (MPL). El adyuvante AS04 es usado hoy en día también en Cervarix®, vacuna contra el virus papiloma humano (GlaxoSmithKline). El aluminio también fue adsorbido con oligonucleótido GpC (Mullen y col., 2008), para una vacuna contra *Plasmodium falciparum*. En cuanto al área veterinaria, la mayoría de las vacunas disponibles en el mercado, están formuladas con hidróxido de aluminio. La combinación del hidróxido de aluminio con saponina fue ensayada previamente, permitiendo destacar un efecto sinérgico de ambos sobre la respuesta inmune (Rivera y col., 2003a, Rivera y col., 2003b, Sun y col., 2008).

Saponina

Las saponinas fueron usadas como emulsificantes en cosmética así como en alimentos y la industria de bebidas. El mecanismo de acción inmunoestimulante no es claro pero algunas explicaciones fueron propuestas. Es probable que interactúen con las CPA para inducir una respuesta inmunoestimulante. La incorporación de las saponinas en las membranas celulares o endosomales podría exponer el antígeno a las proteasas citosólicas. Además, se ha demostrado que las saponinas se intercalan en las membranas celulares, a través de la interacción con el colesterol, formando "agujeros" o poros, lo que puede permitir a los antígenos obtener acceso a la vía endógena de presentación de antígenos y promover la respuesta citotóxica por linfocitos T. Actualmente se discute si la formación de poros hace al efecto adyuvante de saponinas. (Rajput y col., 2007). Las saponinas generan una respuesta

Th1, Th2, respuesta citotóxica por linfocitos CD8⁺ y producción de anticuerpos (Mastelic y col., 2010, Reed y col., 2013).

El extracto crudo obtenido de Quillaja Saponaria, conocido como QuilA, fue usado en vacunas veterinarias (Spickler y col., 2003). Éste posee la capacidad de mejorar la presentación antigénica en las CPA y especialmente induce la producción de linfocitos T citotóxicos (Garçon y col., 2011).

Estudios realizados por el grupo de la Dra. Dallard en glándula mamaria bovina, demuestran el efecto inmunomodulador de extractos de *Panax ginseng* durante el período seco jugando un rol en el control de la mastitis a través del aumento de las defensas intramamarias (Baravalle y col., 2010, Baravalle y col., 2011, Dallard y col., 2011). Previamente, fue evaluado el efecto del ginseng en inmunizaciones hacia patógenos causantes de mastitis bovina como es el caso de *S. aureus* (Hu y col., 2003). En este ensayo se observó un incremento, respecto al control, de la capacidad proliferativa de linfocitos de sangre bovina estimulados con antígenos de *S. aureus*.

Las limitaciones de las saponina como adyuvante derivan de su efecto hemolítico sobre glóbulos rojos, esta actividad hemolítica no se relaciona con su capacidad adyuvante, y se pierde en extractos purificados o en presencia de colesterol y fosfolípidos (Oda y col., 2000, Mastelic y col., 2010). Además, se observó que, sin perder la capacidad inmunoestimulante, la reacción inflamatoria disminuye, en presentaciones con colesterol y fosfolípidos (Spickler y col., 2003).

La utilización de las saponinas, específicamente QS21, derivada de la Quillaja saponaria, se ha descrito en combinaciones a otros componentes en formulaciones de adyuvantes como AS01 (QS21, MPL y Liposomas), AS02 (QS21, MPL y emulsión) y AS15 (Q521, MPL, CpG y liposomas). Estas formulaciones se encuentran en fase 3 de estudios clínicos (Reed y col., 2013).

En trabajos previos, en Laboratorio de Tecnología Inmunológica se evaluó la eficacia de un adyuvante que contiene QS21 (ISCOM, del inglés: immunostimulating complex) en comparación con el hidróxido de aluminio. Se observó que el ISCOM es capaz de generar una mayor respuesta en bovinos inmunizados contra *S. aureus* (Camussone y col., 2014a, Camussone y col., 2014b). En consecuencia, surgió el interés de desarrollar un adyuvante

particulado, basado en fosfolípidos, colesterol y saponina (ISPA, del inglés immunostimulating particles) (Bertona y col., 2013). Nuestro grupo de trabajo demostró previamente, en una inmunización en ratones con una proteína recombinantes de *T. cruzi*, que el adyuvante ISPA generó una respuesta similar a la obtenida con ISCOM en un modelo murino (Bontempi y col., 2014).

En el caso de las vacunas ensayadas hacia *S. uberis*, previamente mencionadas, utilizaron adyuvantes emulsionados como Emulsigen-D (emulsión de agua-aceite y dimetil dioctadecil amonio (DDA) (Fontaine y col., 2002, Prado y col., 2011, Wedlock y col., 2014). En otra oportunidad, se utilizó para las inmunizaciones una mezcla conteniendo Adyuvante de Freund incompleto, 0,1 vol% Tween-20 y SB62 (emulsión) en Quil-A (Leigh y col., 1999).

IV.2 OBJETIVO GENERAL

En base a lo revisado, este capítulo plantea la evaluación, en un modelo bovino, de la respuesta inmune de las proteínas recombinantes elegidas en el capítulo III. Las proteínas son formuladas con tres adyuvantes diferentes: ISPA, hidróxido de aluminio e hidróxido de aluminio en combinación con saponina. El propósito de utilizar diferentes adyuvantes es tratar de determinar cuál de ellos permite potenciar mejor tanto una respuesta sistémica como local, necesario para la protección de mastitis por *S. uberis*.

IV2.1Objetivos particulares

- Inmunizar vaquillonas preñadas con las proteínas recombinantes SUAM-1fr y PauAr formuladas con diferentes adyuvantes.
- Determinar bacteriológicamente que los animales se encuentren libres de infección durante el período completo del estudio.
- Determinar el efecto de la inmunización en los niveles de IgG, IgG₁, IgG₂ específicas en suero.
- Determinar el efecto de la inmunización en los niveles de IgG específicas en leche.

IV.3 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1 Ensayo de inmunización en bovinos

IV.3.1.1 Formulaciones

Las proteínas recombinantes SUAM-1fr y PauAr, obtenidas y seleccionadas en el capítulo III, fueron utilizadas en distintas formulaciones para inmunizar bovinos. Una mezcla conteniendo 0,2 mg de cada uno de los antígenos, se formuló con tres adyuvantes: hidróxido de aluminio (Alhydrogel™; Biogenesis Bagó) 15 % (AL), hidróxido de aluminio 15% con 24 mg de saponina (derivada de Quilaja saponaria) (ALS) e ISPA, (Lipomize SRL). En los grupos controles se reemplazaron las proteínas con solución fisiológica estéril con el adyuvante correspondiente.

Las preparaciones de AL y ALS se llevaron a volumen (2 ml) con solución fisiológica estéril, mientras que a 2 ml de ISPA se le agregó el volumen de proteína correspondiente a 0,2 mg de cada una de las proteínas. Las mezclas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación a 100 r.p.m para permitir la adsorción entre el adyuvante y las proteínas. Todas las preparaciones fueron realizadas en esterilidad y se conservaron en heladera hasta su utilización, por no más de 24 hs.

Nomenclatura de los grupos inmunizados

- Grupo **AL+P**: Proteínas más hidróxido de aluminio
- Grupo **ALS+P**: Proteínas más hidróxido de aluminio y saponina
- Grupo **ISPA+P**: Proteínas más ISPA
- Grupo **ALS**: Control con hidróxido de aluminio y saponina en solución fisiológica
- Grupo **ISPA**: Control con ISPA
- **P**: 0,2 mg SUAM-1fr + 0,2 mg PauAr / dosis

IV.3.1.2 Animales

Vaquillonas Holstein preñadas en el último trimestre de gestación, pertenecientes al rodeo experimental de la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA, fueron inmunizadas con las diferentes formulaciones. Los grupos estuvieron conformados por siete

vaquillonas cada uno. Los animales fueron alimentados con pasturas a base de alfalfa suplementada con grano de maíz desde los 60 hasta los 30 días previos al parto. Luego, se alimentaron con una ración totalmente mezclada (TMR por sus iniciales en inglés) basada en silo de maíz hasta el parto. Posteriormente, fueron alimentadas con TMR suplementada con silo de maíz bajo condiciones de pastoreo (alfalfa). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales en Investigaciones Agropecuarias y Enseñanza (Fass 1999).

IV.3.1.3 Inmunización de bovinos y muestreo.

El protocolo de inmunización y la toma de muestra utilizada fueron realizados de acuerdo a descripciones previas (Camussone y col., 2010). Dos inyecciones de 2 ml fueron aplicadas en forma subcutánea en el área del ganglio supramamario, a los 45 y 15 días anteriores a la fecha estimada de parto. Al momento de la segunda dosis vacunal, las glándulas mamarias de todos los animales incluidos en el experimento se examinaron clínicamente por palpación y se tomaron muestras de secreción pre-parto (calostro) para determinar la presencia de IIM por *S. uberis* u otro microorganismo. Las muestras fueron recolectadas en forma aséptica siguiendo procedimientos estándares (Oliver y col., 2004b). Luego del muestreo los pezones de las vaquillonas fueron sellados con una solución antiséptica conteniendo 0,5% de yodo disponible. Sólo se incluyeron en el ensayo vaquillonas libres de IIM por *S. uberis* y sin signos clínicos de inflamación. Se controló la aparición de reacciones adversas a los inmunógenos a través de la observación clínica periódica.

IV.3.1.4 Toma de muestra

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena coccígea, previo al comienzo del protocolo de inmunización y a los 15 días previos a la fecha de parto. Luego del parto se tomaron muestras de sangre y de leche de cada cuarto mamario, a los 7, 15, 21, 28 y 60 días (Tabla 1). Una alícuota de leche de cada cuarto mamario fue utilizada para cultivo bacteriológico. Una mezcla de leche de los cuatro cuartos, obtenida a partir del día 7 post-parto, se utilizó para la determinación de anticuerpos. Estas muestras se centrifugaron por 15 minutos a 10 000 r.p.m y se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras de sangre se dejaron

coagular mediante incubación a temperatura ambiente y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 1 500 r.p.m por 10 min. Todas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.















Días →	-45	-15	Parto	+7	+15	+21	+28	+60
Dosis								
Toma de muestra leche								
Toma de muestra sangre								

Tabla.1. Esquema de inmunización y toma de muestra. Se inmunizaron vaquillonas Holstein preñadas con las formulaciones AL+P, ALS+P, ISPA+P, AL y ALS. Se indican los días relativos al parto en los que se tomaron muestras de sangre y leche.

IV.3.1.4 Control de sanidad animal.

Para cada una de las instancias de muestreo, se tomaron 10 µl de las muestras de leche obtenidas de cada cuarto mamario de todos los animales del ensayo. Las muestras se procesaron de acuerdo con metodología estándar (Oliver y col., 2004a). Brevemente, se sembraron en un cuadrante de una placa de Agar Sangre y fueron incubadas por 48 hs a 37 °C. Los cocos Gram positivos, catalasa negativos, fueron clasificados sobre la base de morfología de la colonia, prueba de CAMP, hidrólisis de la esculina, crecimiento en caldo cloruro de sodio y utilización de hipurato de sodio. Las vaquillonas que arrojaron un cultivo positivo en cualquier muestra a lo largo del estudio fueron excluidas del mismo. Se definió como IIM la obtención de 2 cultivos positivos consecutivos (Smith y col., 1990).

IV.3.2 Evaluación de la respuesta humoral

Ensayos de inmunodetección mediante ELISA fueron diseñados para determinar la respuesta humoral específica hacia cada uno de los antígenos recombinantes (SUAM-1fr y PauAr), para cada una de las diferentes formulaciones. Las muestras obtenidas a diferentes tiempos, tanto de sueros de sangre como de leche fueron evaluadas, para determinar la cinética de la respuesta humoral.

IV.3.2.1 ELISA para determinar IgG

Microplacas de poliestireno Greiner Bio-One (GBO®, Alemania), fueron sensibilizadas durante 1h a 37°C y toda la noche a 4°C, con 0,5 µg de proteína (PauAr o SUAM-1fr) disuelta en buffer carbonato pH: 9,6. Luego de bloquear los sitios de unión inespecífica con 200 µl de PBS-leche de cabra descremada 5% incubado 30 min a 37°C, se agregaron los sueros diluidos a evaluar (leche 1/ 100 y sangre 1/ 2 000), en PBS-leche de cabra descremada 1 %, y se incubó 1 h a 37°C. Posteriormente, se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG bovina total conjugado a peroxidasa (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU), diluido 1/6 000 en PBS-leche de cabra descremada 1% y se incubó 1 h a 37°C. El sustrato de la enzima que se utilizó fue H₂O₂ en presencia de TMB (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU), y se frenó la reacción con H₂SO₄ 2N. Entre cada una de las incubaciones se realizaron 3 lavados de 60 segundos con PBS-Tween 20 0,05%. Las lecturas se efectuaron a 450 nm en lector de ELISA (ELX 808, BioTek® EE.UU).

IV.3.2.2 ELISA para determinar subclases de IgG (IgG₁ e IgG₂)

Sobre las muestras de sangre del día +7, se determinaron los niveles de IgG₁ e IgG₂. El ensayo de ELISA se realizó como se describió en el punto 3.2.1, con modificaciones. Brevemente, luego de la incubación de los sueros de sangre, se agregó el segundo anticuerpo, ambos monoclonales de ratón anti-IgG₁ (Serotec) diluido 1 / 1 000 o anti-IgG₂ bovina. Un tercer anticuerpo se utilizó para revelar el sistema, se incubó 1 h a 37°C con un anticuerpo anti-IgG total de ratón conjugado a peroxidasa (Jackson Immunoresearch, Baltimore, MD, EE.UU) en una dilución 1 / 2 000 en PBS-leche de cabra descremada al 1 %. El sistema de revelado fue el mismo utilizado en el punto 3.2.1.

IV.3.3 Análisis estadístico.

Las comparaciones estadísticas de los resultados se llevaron a cabo por medio el programa GraphPad (PRISM, versión 7.0, San Diego, EE.UU). Las diferencias se analizaron mediante Kruskal Wallis, seguido por test de Mann Whitney o post test Dunn, para detectar diferencias entre pares ($p < 0,05$).

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1 Ensayo de inmunización – Animales

De los 35 animales incluidos inicialmente en el estudio, 1 animal del grupo ALS+P fue descartado debido a la presencia de IIM al pre-parto, y 1 animal del grupo AS+P y otro del grupo ISPA+P fueron excluidos del ensayo por parto adelantado. Las 32 vaquillonas restantes del ensayo parieron en promedio 47 días después de la primera dosis de vacuna y 17 días después de la segunda dosis. No se observaron reacciones adversas a la inmunización en ninguno de los animales incluidos en el ensayo. Los grupos inmunizados con los adyuvantes ALS e ISPA, presentaron una induración en la zona de inoculación (<5 cm), observada al realizar la segunda inoculación, motivo por el cual se inoculó en una zona adyacente.

IV.4.2 Respuesta de anticuerpos en sangre

IV.4.2.1 Estudio de IgG en sangre

La respuesta humoral de los animales inmunizados fue evaluada a lo largo del ensayo, para ello se diseñó un ELISA indirecto con el fin de estudiar los niveles de IgG específicas hacia cada uno de los antígenos recombinantes (SUAM-1fr y PauAr). Los sueros se utilizaron diluidos 1/ 2 000.

IV.4.2.1.2 Respuesta hacia SUAM-1fr

Los niveles de IgG específicos hacia SUAM-1fr fueron evaluados en todas las muestras. La respuesta cinética se grafica en la Figura 3 y su análisis estadístico se muestra en la Tabla 2.

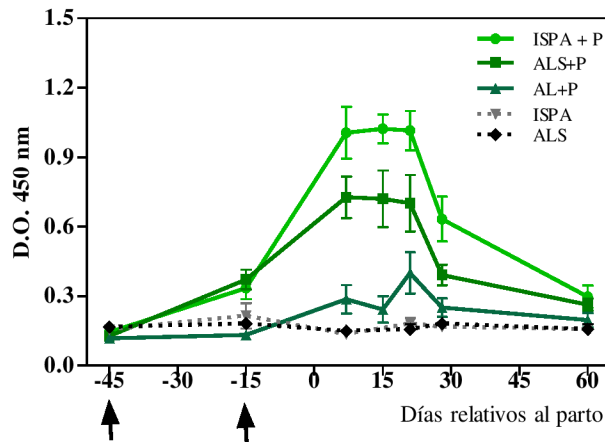


Figura.3. Cinética de producción de IgG anti-SUAM-1fr en suero. Vaquillonas Holstein preñadas inmunizadas con las formulaciones ISPA+P, ALS+P, AL+P, ISPA o ALS a los días 45 y 15 previos al parto (dosis indicadas con flechas). En las muestras de suero tomadas a distintos tiempos se determinaron los niveles de IgG anti-SUAM-1fr mediante ELISA. Día 0, hace referencia a la fecha probable de parto (FPP). Para cada punto se representa la media \pm EEM.

	p (-15)	p (+7)	p (+15)	p (+21)	p (+28)	p (+60)
ISPA+P vs ALS+P	0,5338	0,2677	0,0732	0,1375	0,3939	1,0000
ISPA +P vs AL+P	0,0012	0,0101	0,0051	0,0087	0,0140	0,2020
ALS+P vs AL+P	0,0023	0,0070	0,0111	0,2949	0,1014	0,1807
ISPA+P vs ISPA	0,0085	0,0079	0,0043	0,0095	0,0056	0,1061
ALS+P vs ALS	0,0082	0,0061	0,0061	0,0242	0,0078	0,1143

Tabla.2. Cinética de producción de IgG anti-SUAM-1fr en suero. Representación de las diferencias significativas obtenidas con el Test Mann-Whitney entre grupos para cada punto de toma de muestra estudiado. P: SUAM-1fr+PauAr, p: valor de probabilidad. Color celeste: diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos inmunizados respecto a su control correspondiente (sin proteínas), color verde: diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos inmunizados con diferentes adyuvantes.

En los sueros obtenidos previamente a la inmunización de las vaquillonas, no se detectaron anticuerpos anti-SUAM-1fr. Luego de la inmunización, las vaquillonas inoculadas con ISPA+P presentaron niveles de IgG anti-SUAM-1fr en sangre, significativamente

superiores a los presentes en los animales inmunizados con AL+P desde el día -15 y se mantuvieron significativamente elevados hasta el día 28 post-parto (Tabla 2). Por otro lado, los niveles de IgG hacia SUAM-1fr obtenidos con ISPA+P y ALS+P, no presentaron niveles significativamente diferentes entre ellos a lo largo del ensayo (Tabla 2). Si bien no se observaron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos obtenidos con ISPA+P y con ALS+P, entre los días 7 y 28 post-parto los niveles obtenidos con ISPA fueron 25% superiores a los obtenidos con ALS. Los niveles de anticuerpos anti-SUAM-1fr obtenidos con ALS+P fueron significativamente superiores a los del grupo AL+P desde el día -15 antes de la fecha probable de parto (FPP) hasta el día +15 post-parto (Tabla 2). La mayor concentración de esta inmunoglobulina se registró en los tres grupos (AL+P, ALS+P e ISAP+P) luego de los 7 días de ocurrido el parto manteniéndose elevados hasta el día 21 post-parto. Los niveles de anti-SUAM-1fr obtenidos con los adyuvantes ISPA (ISPA+P) y ALS (ALS+P) fueron significativamente mayores respecto a sus controles (ISPA y ALS), excepto a los 60 post-parto (Tabla 2). Los controles con los diferentes adyuvantes no presentaron IgG específica hacia SUAM-1fr durante todo el período evaluado.

IV.4.2.1.3 Respuesta hacia PauAr

Los niveles de IgG específicos hacia PauAr fueron evaluados en todas las muestras obtenidas. La cinética de respuesta se grafica en la Figura 4 y su análisis estadístico se muestra en la Tabla 3.

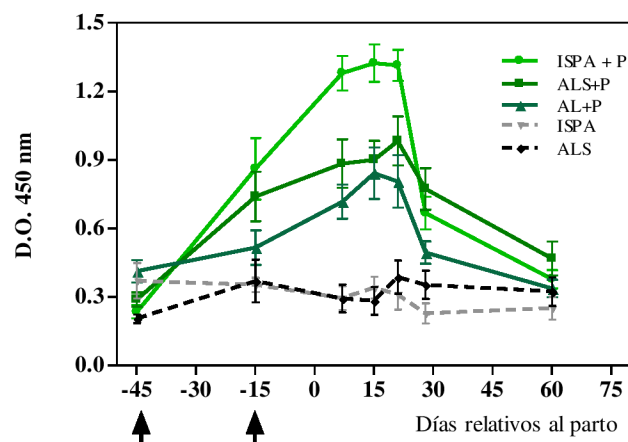


Figura.4. Cinética de producción de IgG anti-PauAr en suero. Vaquillonas Holstein preñadas inmunizadas con las formulaciones ISPA+P, ALS+P, AL+P, ISPA o ALS a los

días 45 y 15 previos al parto (dosis indicadas con flechas). En las muestras de suero tomadas a distintos tiempos se determinaron los niveles de IgG anti-PauAr mediante ELISA. Día 0, hace referencia a la fecha probable de parto (FPP). Para cada punto se representa la media \pm EEM.

	p (-15)	p (+7)	p (+15)	p (+21)	p (+28)	p (+60)
ISPA+P vs ALS+P	0,5887	0,1255	0,0303	0,1014	0,7308	0,9361
ISPA +P vs AL+P	0,2324	0,0051	0,0710	0,0452	0,2949	0,2833
ALS+P vs AL+P	0,2949	0,2343	0,9015	0,5350	0,1649	0,6282
ISPA+P vs ISPA	0,1380	0,0079	0,0079	0,0043	0,0043	0,1199
ALS+P vs ALS	0,0667	0,0381	0,00121	0,0242	0,0727	0,4762

Tabla.3. Cinética de producción de IgG anti-PauAr en suero. Representación de las diferencias significativas obtenidas con el Test Mann-Whitney entre grupos para cada punto de toma de muestras estudiado. P: SUAM-1fr+PauAr, p: valor de probabilidad. Color celeste: diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos inmunizados respecto a su control correspondiente (sin proteínas), color verde: diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos inmunizados con diferentes adyuvantes.

No se detectaron anticuerpos anti-PauAr en los sueros pre-inmunes (día -45). Las vaquillonas inoculadas con ISPA+P presentaron niveles de IgG anti-PauAr en sangre significativamente superiores ($p < 0,05$) a los presentes en los animales inmunizados con ALS+P, solamente a 15 días post-parto (Tabla 3). Los niveles de IgG específica en ISPA+P fueron significativamente mayores respecto a AL+P entre los días 7 y 21 después del parto (Tabla 3). Por otro lado, los niveles de anti-PauAr obtenidos con ISPA+P y ALS+P fueron significativamente mayores respecto a los de sus respectivos controles (ISPA y ALS), excepto a los 60 post-parto. La mayor concentración de IgG se registró en los tres grupos (AL+P, ALS+P e ISAP+P) entre el día 7 hasta el día 28 post-parto (Figura 4). Los controles con los diferentes adyuvantes no mostraron niveles de IgG específica hacia PauAr durante todo el período evaluado (Figura 4).

IV.4.2.2 Estudio de subclases de inmunoglobulinas en sangre

Las subclases IgG₁ e IgG₂, fueron evaluadas mediante ELISA. Para ello se trabajó con las muestras de suero tomadas a los 7 días post-parto. Este es el punto en el que se detectó la máxima producción de anticuerpos según las curvas de cinéticas realizadas (Figuras 3 y 4). Se consideró, que en los días 15 y 21 los niveles de IgG no tuvieron grandes variaciones. Como control, se utilizó una mezcla de sueros de los controles realizados (ISPA y ALS) ya que en ninguna de esas muestras se detectaron anticuerpos específicos.

IV.4.2.2.1 Niveles de IgG1 en sangre

Los niveles de IgG₁ hacia SUAM-1fr y PauA, observados entre los diferentes adyuvantes no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Figura 5). Sin embargo, las medias de los niveles de IgG₁ obtenidas con ALS e ISPA fueron aproximadamente dos veces mayor a los obtenidos con AL (Tabla 4), tanto para SUAM-1fr como para PauAr. Los niveles de IgG₁ determinados en todos los grupos inmunizados fueron significativamente mayores que los del grupo Control ($p < 0,05$) (Figura 5 A y B).

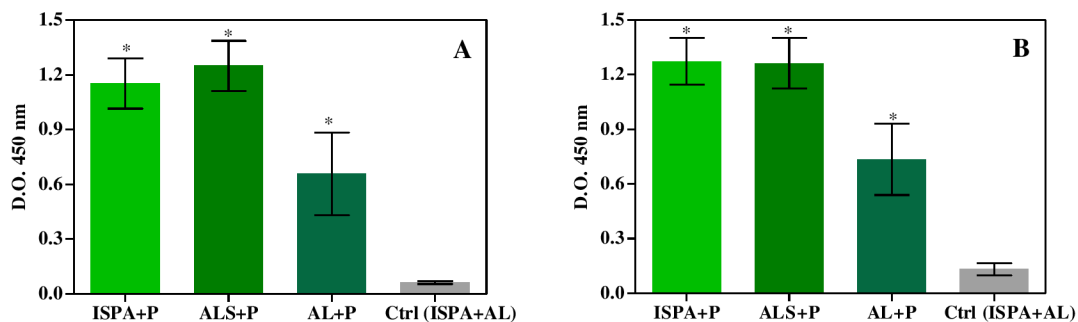


Figura.5. Niveles de IgG₁ generados por PauAr y SUAM-1fr en sangre. A: IgG₁ específica hacia SUAM-1fr obtenida con los diferentes adyuvantes. **B:** IgG₁ específica hacia PauAr obtenida con los diferentes adyuvantes. (*) Indican diferencias significativas, respecto al grupo control ($p < 0,05$; Mann-Whitney). Para cada grupo se representa la media \pm EEM.

	ISPA+P	ALS+P	AL+P
IgG₁-SUAM-1fr (mediana ± ES)	1,18 ± 0,14	1,23 ± 0,14	0,42 ± 0,22
IgG₁-PauAr (mediana ± ES)	1,32 ± 0,13	1,19 ± 0,14	0,47 ± 0,20

Tabla.4. Valores de D.O. medios de IgG₁ obtenidos con los diferentes adyuvantes, los niveles de IgG₁ obtenidos con ISPA y ALS fueron entre 2,8 – 2,9 superiores a los obtenidos con AL.

IV.4.2.2.2 Niveles de IgG₂ en sangre

Los niveles de IgG₂ hacia SUAM-1fr y PauA, observados entre los diferentes adyuvantes no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (Figura 6). Sin embargo, la media de los niveles de IgG₂ hacia SUAM-1fr con ALS e ISPA duplicó al valor obtenido con AL (Tabla 5). Los niveles de la subclase IgG₂ en todos los grupos inmunizados fueron significativamente mayores que el grupo control ($p < 0,05$) (Figura 6 A y B).

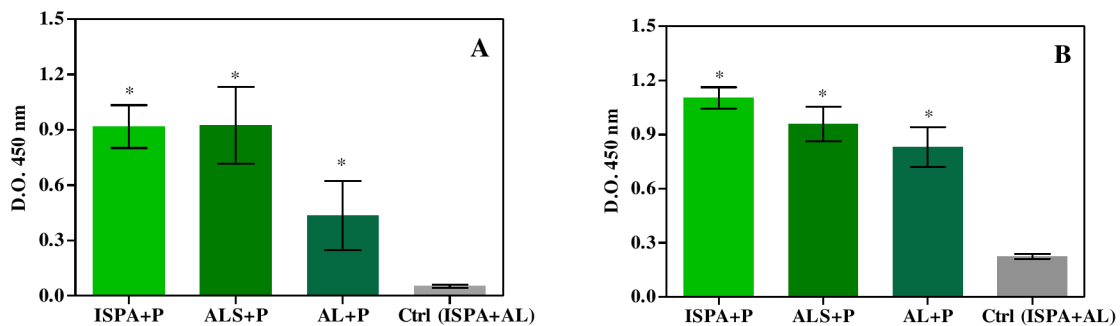


Figura.6. Niveles de IgG₂ generados por PauAr y SUAM-1fr en sangre. A: IgG₂ específica hacia SUAM-1fr obtenidos con los diferentes adyuvantes. **B:** IgG₂ específica hacia PauAr obtenidos con los diferentes adyuvantes. (*) Indican diferencias significativas, respecto al grupo control ($p < 0,05$; Mann-Whitney). Para cada grupo se representa la media ± EEM.

	ISPA+P	ALS+P	AL+P
IgG₂-SUAM-1fr (mediana ± ES)	0,94 ± 0,11	0,90 ± 0,20	0,17 ± 0,18
IgG₂-PauAr (mediana ± ES)	1,13 ± 0,05	1,01 ± 0,09	0,78 ± 0,11

Tabla.5. Valores de D.O. medios obtenidos de IgG₂ con los diferentes adyuvantes, los niveles de IgG₂ obtenidos con ISPA y ALS fueron entre 5,52 -1,44 superiores a los obtenidos con AL.

IV.4.3 Respuesta de anticuerpos en leche

La respuesta inmune humoral local, en la glándula mamaria, fue estudiada midiendo los niveles de IgG específica hacia los antígenos recombinantes en leche, obtenidos con los distintos adyuvantes. La cinética de respuesta fue evaluada preliminarmente y se observó una disminución rápida y progresiva de los anticuerpos luego del día 7 post-parto. Por este motivo, se decidió evaluar la IgG sobre las muestras de leche de todos los animales en este punto, utilizando una dilución 1/100.

IV.4.3.1 Niveles de IgG en leche

Respuesta hacia SUAM-1fr y PauAr

Los niveles de IgG en leche obtenidos con los tres adyuvantes fue significativamente superior a los de los grupos controles ($p < 0,05$) (Figura 7). Los niveles de anticuerpos específicos hacia SUAM-1fr y PauAr fueron similares con los tres adyuvantes ($p > 0,05$) (Figura 7).

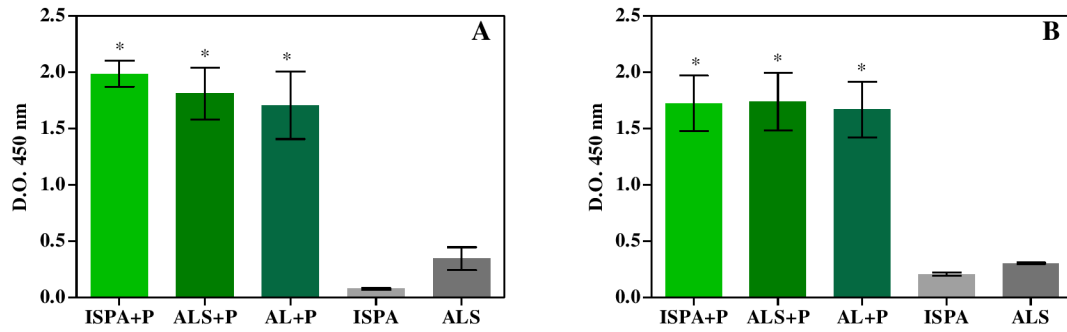


Figura.7. Niveles de IgG generados por PauAr y SUAM-1fr en leche. A: IgG específica hacia SUAM-1fr obtenidos con los diferentes adyuvantes. **B:** IgG específica hacia PauAr obtenidos con los diferentes adyuvantes. (*) Indican diferencias significativas, respecto a los grupos controles ($p < 0,05$; Mann-Whitney). Para cada grupo se representa la media \pm EEM.

IV.5 DISCUSIÓN

El diseño y la construcción de una vacuna a subunidad es una tarea difícil, ya que los antígenos tendrán que ser seleccionados sobre la base de su capacidad en generar una respuesta inmune protectora. A su vez, la biotecnología ha logrado implementar el diseño de vacunas con epítopes o fracciones de proteínas recombinantes y diseñar adyuvantes adecuados para la obtención de la respuesta inmune deseada.

En esta parte del trabajo, el objetivo central fue evaluar la respuesta inmune humoral desarrollada frente a las proteínas recombinantes PauAr y SUAM-1fr, en vaquillonas preñadas, utilizando diferentes adyuvantes para potenciar la respuesta: $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Al}(\text{OH})_3$ más saponina e ISPA.

Éste es el primer informe del uso de PauA y SUAM combinadas en una formulación multicomponente como vacuna para mastitis bovina por *S. uberis*. La utilización de $\text{Al}(\text{OH})_3$ más saponina en vacunas veterinarias, fue previamente reportado (Hu y col., 2003), pero es el primer ensayo realizado en bovinos con ISPA.

El plan de inmunización planteado surge de la necesidad de generar protección al parto y post-parto debido a que los patógenos ambientales son la causa más relevante de mastitis en ese período (Fox 2009), siendo *S. uberis* el más común en vaquillonas al parto. Además, la protección en estos animales evita las pérdidas en producción futura ya que la enfermedad afecta la glándula mamaria alterando su histología (De Vlieghe y col., 2008, Piepers y col., 2009). En este trabajo se utilizaron 2 dosis de 0,2 mg de cada proteína por dosis, mientras que en otros ensayos de vacunación contra *S. uberis*, se administraron entre 3 y 6 dosis durante el período seco (Finch y col., 1994, Leigh y col., 1999, Prado y col., 2011, Wedlock y col., 2014). La ventaja de utilizar menos dosis junto con un adyuvante que permita potenciar la respuesta, es la disminución de costos al productor, no sólo del producto en sí, sino también de servicios veterinarios. La dosis utilizada de proteína recombinante está en línea con lo reportado para la vacunación de bovinos con SUAMr en donde se observó que la respuesta humoral no aumentaba frente a la utilización de 0,4 mg o 0,2 mg de proteína por dosis (Prado y col., 2011).

La vía de inoculación utilizada en este trabajo fue la subcutánea en la región supramamaria. Previamente se reportó una respuesta más efectiva con inoculaciones

subcutáneas respecto a la vía intramamaria, generando mayores niveles de IgG₂ (Finch y col., 1994). Por otro lado, la inoculación de una formulación basada en *S. aureus* inactivado con Al(OH)₃ en la región supramamaria fue más efectiva que la inoculación en la tabla del cuello, obteniéndose mayores niveles de anticuerpos tanto en sangre como en leche (Camussone y col., 2010).

Si bien los animales inmunizados con ALS e ISPA presentaron una induración local menor a 5 cm, los animales en los diferentes grupos no presentaron reacciones adversas significativas. En este trabajo se observó que la induración local en los animales inmunizados no estaría relacionada con una intensidad limitada de la respuesta inmune por tal causa, como se ha reportado en casos de inflamación severa (Hughes 1998). Además, los resultados obtenidos con ISPA están en línea con lo que se ha reportado sobre la utilización de saponina como adyuvante donde la combinación con colesterol disminuye la inflamación local sin provocar pérdida de su poder adyuvante (Kersten y col., 1995).

La evaluación de la respuesta inmune humoral sistémica hacia cada una de las proteínas demostró que la respuesta de IgG contra ambas fue mayor en los animales inmunizados con ISPA, seguido por ALS y por último, AL. Como se mencionó en el capítulo III, si bien SUAM-1fr fue una de las fracciones de SUAM menos inmunogénica en ratones, fue elegida por haber generado anticuerpos funcionalmente mejores. En la respuesta de IgG anti-SUAM-1fr, se observó que el AL no fue suficientemente efectivo para generar una respuesta humoral, mientras que ISPA y ALS generaron una respuesta significativamente mayor, sugiriendo que estos adyuvantes permiten inducir una respuesta aceptable aún con un inmunógeno supuestamente débil.

Los mayores niveles de anticuerpos hacia PauAr y SUAM-1fr fueron observados entre los días 7 y 21 post-parto, con una disminución al día 60 post-parto. En ese punto no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control. De este modo, se puede decir que la respuesta inmune de los animales con la incorporación de más de un antígeno a la formulación, no altera la inmunogenicidad individual de cada molécula utilizada. Los bajos niveles de anticuerpos a los 60 días post-parto observados para ambas proteínas y con tres adyuvantes diferentes, sugerirían la necesidad de un refuerzo 7 días después del parto. Ese tipo de esquema de inmunización se ha reportado previamente para *S. uberis* (Prado y col.,

2011). Los niveles de anticuerpos obtenidos están en línea con lo determinado en los trabajos mencionados. Sin embargo, en ninguno de ellos se evaluó la cinética de inmunoglobulinas más allá de los 14 a 21 días post-parto. Cabe hacer la salvedad de que se compararon nuestros resultados con trabajos que contaban con mayor similitud con el ensayo realizado en esta tesis.

La homogeneidad en la respuesta humoral dentro de los grupos inmunizados, fue mayor en los animales inmunizados con ISPA, tanto hacia SUAM-1fr como hacia PauAr, esto es de importancia para el desarrollo de una vacuna ya que se busca una protección homogénea en todos los animales inmunizados.

Las subclases de IgG en sangre fueron determinadas mediante ELISA al día 7 post-parto, punto donde se observó el pico de IgG durante la evaluación de la respuesta cinética. Los niveles observados de IgG₁ e IgG₂ hacia SUAM-1fr y PauAr, fueron significativamente elevados respecto del control aunque entre los adyuvantes no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, cabe destacar que con ISPA y ALS los anticuerpos específicos tanto en IgG₁ como en IgG₂, fueron entre 2,8-2,9 y 5,5-1,4 veces mayores, respectivamente, a los obtenidos con AL. La relación de IgG₁/IgG₂ fue cercana a uno, lo que indicaría una respuesta inmune Th1/Th2 balanceada. En 1983 se reportó que los niveles de la subclase IgG₁ en sangre bovina de animales sanos son mayores que los niveles de IgG₂ (Butler 1983). Por lo tanto estos resultados están indicando que la inmunización generó un aumento de la subclase IgG₂.

La respuesta local a nivel de la glándula mamaria fue evaluada mediante ELISA determinando los niveles de IgG en leche. Los niveles de IgG durante una evaluación preliminar, fueron superiores a los 7 días post-parto en todos los grupos inmunizados y disminuyeron progresivamente hasta el día 60 post-parto. Estos resultados no son sorprendentes ya que se ha reportado que a medida que aumenta la producción de leche se produce un efecto de dilución de las inmunoglobulinas debido a la producción de 2-4 L/cuarto/día durante la lactación (Riollet y col., 2000). También se observó que factores de estrés agudo (como puede ser un parto traumático) pueden reducir la tasa de transferencia de Ig desde sangre a secreción láctea en glándula mamaria (Mallard y col., 1998). Debido a estos motivos y con el objetivo de tener una muestra representativa de la respuesta inmune, sin estar

afectada por factores fisiológicos como el parto y la lactancia, se considera para ensayos futuros evaluar las Ig en muestras de calostro al pre-parto.

Tanto en el caso de IgG en leche anti-SUAM-1fr como anti-PauAr la respuesta no tuvo diferencias significativas entre los tres adyuvantes. Con ambas proteínas los niveles de IgG específicas, obtenidos con los diferentes adyuvantes fueron mayores respecto a los grupos controles. Estos resultados nos indican que a pesar de tener una respuesta sistémica mejorada con ISPA y ALS frente a AL los niveles de anticuerpos en glándula son semejantes entre ellos. Con respecto a las subclases de IgG en la glándula mamaria, se ha descrito que en un estado saludable de la misma, la inmunoglobulina que predomina es la IgG₁, y la concentración es entre 10-20 veces mayor a la de IgG₂ (Barrio y col., 2003). Los niveles de IgG₂ en la leche se incrementan durante la inflamación de la glándula mamaria (Wellnitz y col., 2013). Esto se debe a que durante la inflamación de la glándula, se produce una masiva fuga de componentes desde la sangre a la leche, a causa de la alteración de la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Burton y col., 2003). Además, bajo condiciones inflamatorias, tanto la IgG₁ como IgG₂ aumentan un 50% tanto en calostro como en leche (Guidry y col., 1980). Por lo tanto, la evaluación de subclases de Ig toma un significado cuando se evalúan frente a un desafío y debido a esto se propondrá para ensayos futuros de inmunización. No obstante, el hecho de que la inmunización haya inducido la producción de IgG₂ específicas en sangre resulta alentador y nos permitiría sugerir que frente a una inflamación, esta subclase estaría presente en leche.

Teniendo en cuenta la importancia de la respuesta celular en el control de la infección por *S. uberis*, también se recuperaron células mononucleares de sangre periférica de los animales inmunizados, para continuar con la caracterización de la respuesta a las diferentes formulaciones. Por otra parte, también se considera evaluar la capacidad protectora de los anticuerpos bovinos, mediante la realización de ensayos funcionales. En conjunto, la información obtenida contribuirá a la selección de una formulación y su eventual optimización para proponer finalmente una vacuna para el control de mastitis bovina por *S. uberis*.

IV.6 CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados de esta etapa del trabajo demostraron que las proteínas SUAM-1fr y PauAr, administradas en dos dosis, a los 45 y 15 días previos a la fecha probable de parto, fueron eficientes en generar altos niveles de anticuerpos específicos en sangre y leche contra los componentes proteicos de las formulaciones. En todos los casos los grupos inmunizados mostraron niveles de anticuerpos superiores a los controles. Además, los resultados demuestran que la incorporación de más de un antígeno a la formulación, no altera la inmunogenicidad individual de cada molécula. Las diferentes formulaciones evaluadas indicarían que el agregado de saponina podría potenciar la respuesta inmune humoral.

La importancia de este trabajo radica en que es el primero en el que se realizan inmunizaciones con dos antígenos recombinantes combinados hacia *S. uberis* y evaluando tres adyuvantes, con el propósito de enfocar la protección hacia una respuesta humoral y celular, balanceada. Cabe destacar además, que los trabajos realizados hasta el momento en bovinos, sólo emplean una molécula recombinante, el microorganismo entero o un extracto de proteínas del microorganismo libre de células. Es decir, que nuestro trabajo constituye un aporte novedoso en el desarrollo de vacunas contra infecciones bovinas causadas por *S. uberis* dado que demuestra la posibilidad de formular una vacuna multicomponente.

CONCLUSIONES GENERALES

Los productos codificados por los genes sua y pauA son propuestos como candidatos a inmunógenos considerando la elevada prevalencia y conservación de los mismos.

Las proteínas recombinantes SUAM-1fr y PauAr son propuestas como potenciales componentes de una vacuna a subunidad contra la mastitis bovina por *S. uberis* considerando propiedades como actividad e inmunogenicidad de la proteína recombinante, y especificidad y funcionalidad de los anticuerpos inducidos

La formulación basada en estos dos antígenos recombinantes con el agregado de saponina resultó eficiente en inducir una respuesta inmune humoral en vaquillonas Holstein, evidenciada por un elevado nivel de anticuerpos específicos en sangre y leche.

Este trabajo de tesis posee constituye un aporte novedoso en el desarrollo de vacunas contra infecciones mamarias en bovinos causadas por *S. uberis*, basado en la formulación de una vacuna multicomponente.

ANEXO 1: Soluciones y medios de cultivos

1. Soluciones y Medio de cultivo Capítulo II

1.1 Aislamientos bacterianos

1. **Cultivo Tripteína soya suplementado, caldo:** TSB (Tripteína Soya Broth: Tripteína 17 g/l, Peptona de soya 3 g/l, NaCl 5 g/l, Fosfato dipotásico 2,5 g/l, Glucosa 2,5g/l), suplementado con Extracto de levadura 7,5 gr, Sacarosa 5 gr, $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 5 gr, llevado a 1000 ml con agua destilada (pH 7,3 +/- 0,2).
2. **Cultivo Tripteína soya suplementado agar:** TSB (Tripteína Soya Broth: Tripteína 17 g/l, Peptona de soya 3 g/l, NaCl 5 g/l, Fosfato dipotásico 2,5 g/l, Glucosa 2,5g/l) 30 gr, suplementado con Extracto de levadura 7,5 gr, Sacarosa 5 gr, $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$ 5 gr, Agar 15 gr, llevado a 1000 ml con agua destilada (pH 7,3 +/- 0,2).
3. **Agar Sangre:** Agar tripteína soya, Sangre bovina 5 % (v/v)

1.2 Extracción de ADN genómico de *Streptococcus uberis*

1. Buffer TE: 10 mM Tris-ClH-5 mM EDTA (pH 7,8)
2. Buffer de ruptura de pared celular: 375µl buffer Tris-ClH 5mM y EDTA 10mM (pH 7,8) conteniendo 30 U/ml de mutanolisina y 10 mg/ml de lisozima.
3. Buffer de lisis: 20% SDS en 50mM Tris-ClH, 20 mM de EDTA (pH 7,8)

1.3 Electroforesis en gel de agarosa

1. Buffer TAE1X: Tris-acetato 40 Mm pH 8, EDTA 1 mM
2. Solución de siembra: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v), Glicerol 30% (v/v)

1.4 Tipificación molecular mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

1. Buffer PIV: NaCl 1 M; Tris-HCl (pH 8) 10 mM.
2. Buffer EC: Tris-HCl (pH 8) 6 mM; NaCl 1 M; EDTA (pH 8) 100 mM; Deoxicolato de sodio 0,2%; Laurilsarcosina de sodio 0,5%; Brij-58 0,5%.
3. Buffer EC-Lisis: Buffer EC 1X; ARNasa 5µg/mL; Lisozima 100 µg/mL; Lisostafina 10µg/mL.

4. Buffer ES-P: Buffer ES (EDTA (pH 9) 0,5 M; Laurilsarcosina de sodio 0,5% P/V.1X), Proteinasa K 0,05% (p/v).
5. Buffer TE: Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM; EDTA(pH 8) 1 mM.
6. Buffer Pre-SmaI 1X: Tris-HCl (pH 8) 6 mM; MgCl₂.6H₂O 6mM; KCl 20 mM.
7. Buffer loading 6X: Glicerol 30% (v/v); Azul de bromofenol 0,25 % (v/v).
8. Buffer TBE 0,5X: Se preparó a partir de una dilución 1/20 del TBE 10X.
9. Buffer TBE 10X: Tris base 890 mM; Ácido Bórico 890 mM; EDTA (pH 8) 20 mM.

2. Soluciones y Medios de cultivo Capítulo III

2.1 Medios de cultivo

1. Medio Luria Bertani caldo (LB): peptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5 %p/v ClNa 0,5 %, pH: 7,5).
2. LB agar: (peptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5 %p/v ClNa 0,5 %, agar 25 p/v, pH: 7,5).
3. Medio Infusión cerebro corazón (BHI, se sus siglas en ingles **Brian Heat Infusion**) Britania: Fórmula: Infusión de cerebro de ternera 200 g/l, Infusión corazón vacuno 250 g/l, Peptona 10 g/l, ClNa 5 g/l, Glucosa 2g/l, Fosfato disódico 2,5 g/l, pH final: 7.4 ± 0,2.

2.2 Soluciones amortiguadoras

1. PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 M, Na₂HPO₄ 10M, K₂HPO₄ 1,8M, pH:7,4
2. PBD-Tween PBS, Tween20 0,05%.
3. Buffer Carbonato: NaHCO₃ 0,035M, NaCO₃ 0,015 M, pH: 9,6
4. Buffer de conservación de proteínas: MOPS 40 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoentanol 1 mM. pH:7,3

2.3 Transformación de bacterias E. coli por técnica de CICA (Clásica)

1. Solución de transformación 1 (ST1): MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH: 7
2. Solución de Transformación 2 (ST2): MOPS 100 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH: 6,5

2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

1. Gel de apilamiento: Tris- HCl, pH 6,8 130 mM, SDS 0,05% (p/v), Acrilamida/Brisacliamida (29:1) 4,8% (p/v), TEMED 0,1 % (p/v), Persulfato de amonio 0,05 % (p/v).
2. Gel de separacion: Tris- HCl, pH 8,8 375 mM, SDS 0,1 % (p/v), Acrilamida/Brisacliamida (29:1) 15% (p/v), Glicerol 10% (p/v), TEMED 0,06 % (p/v), Persulfato de amonio 0,05 % (p/v).
3. Buffer de corrida: Tris- HCl, pH 8,3 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 % (p/v).
4. Buffer de siembra 2X: Tris- HCl, pH 6,8 125 mM, SDS 4 % (p/v), Glicerol 20% (p/v), β -mercaptoetanol 5 % (v/v), Azul de Bromofenol 0,2 % (p/v).

2.5 Tinción de Coomasie

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

2.6 Tinción con Plata

1. Solución de fijación: Etanol 30% (v/v), Ácido acético 10% (v/v)
2. Solución de sensibilización: Tiosulfato de plata 0,8 mM
3. Solución de nitrato de plata: AgNO_3 12 mM
4. Solución de revelado: Na_2CO_3 3% (p/v), Formalina 0,25 % (v/v), Tiosulfato de Sodio 0,125% (v/v)
5. Solución de frenado: Tris 4 % (p/v), Ácido acético 2% (v/v)

2.7 Purificación de proteínas – Cromatografía de pseudoafinidad

1. Solución de equilibrado (SE): (Na_2HPO_4 50mM ph: 8, NaCl 300mM, imidazol 20mM)
2. Solución de elución 2 (SE2): (Na_2HPO_4 50mM ph: 8, NaCl 300mM, imidazol 50mM)
3. Solución de elución 3(SE3): (Na_2HPO_4 50mM ph: 8, NaCl 300mM, imidazol 100mM.)
4. Solución de elución 4 (SE4): (Na_2HPO_4 50mM ph: 8, NaCl 300mM, imidazol 250mM)

5. Solución de elución 5 (SE5): (Na_2HPO_4 50mM ph: 8, NaCl 300mM, imidazol 500mM)

2.8 Western Blot

1. Buffer transferencia: Glicina 129 mM, Tris 25 mM y Etanol 10 %
2. Solución de revelado: PBS 10 ml, DMSO 1,5 % (v/v), H_2O_2 , 0,1% (v/v), Diaminobencidina 0,05 % (p/v).

2.9 Ensayo de adherencia

- Medio de cultivo de células (MCC): Medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) 40%, RPMI 40 %, suero fetal bovino 10% de, L-glutamina 2 mM, insulina bovina $\mu\text{g/ml}$ de, y de hidrocortisona 1 $\mu\text{g/ml}$, buffer HEPES 40 mM, Piruvato de Sodio 1 mM.

2.10 Ensayo de opsonofagocitosis

1. **FITC/ NaCO_3** : FITC 0,1 mg/ml
2. **RPMI suplementado.** RPMI 100ml, MgSO_4 0,6 mM, CaCl_2 22 mM, BSA 0,1% (p/v)
3. **Solución de frenado:** NaCl 0,85 % (p/v), EDTA 0,04 % (p/v) pH=7,2
4. **Buffer de citometría:** EDTA 0,5 mM, Azida sódica 0,01 g% (p/v), ASB 1% (p/v), Llevar a volumen con PBS, pH= 7,2-7,4.
5. **PBS-BrEt:** Bromuro de etidio 5mg/ml, llevar a volumen con PBS
6. **Azul de Tripán:** Azul de tripán 0,4 % (p/v), llevar a volumen con PBS.
7. **Solución de Turk:** Violeta de Genciana 0,01% (p/v), Ácido acético 2ml, llevar a volumen con PBS

ANEXO 2: Material complementario

1. Material complementario Capitulo II

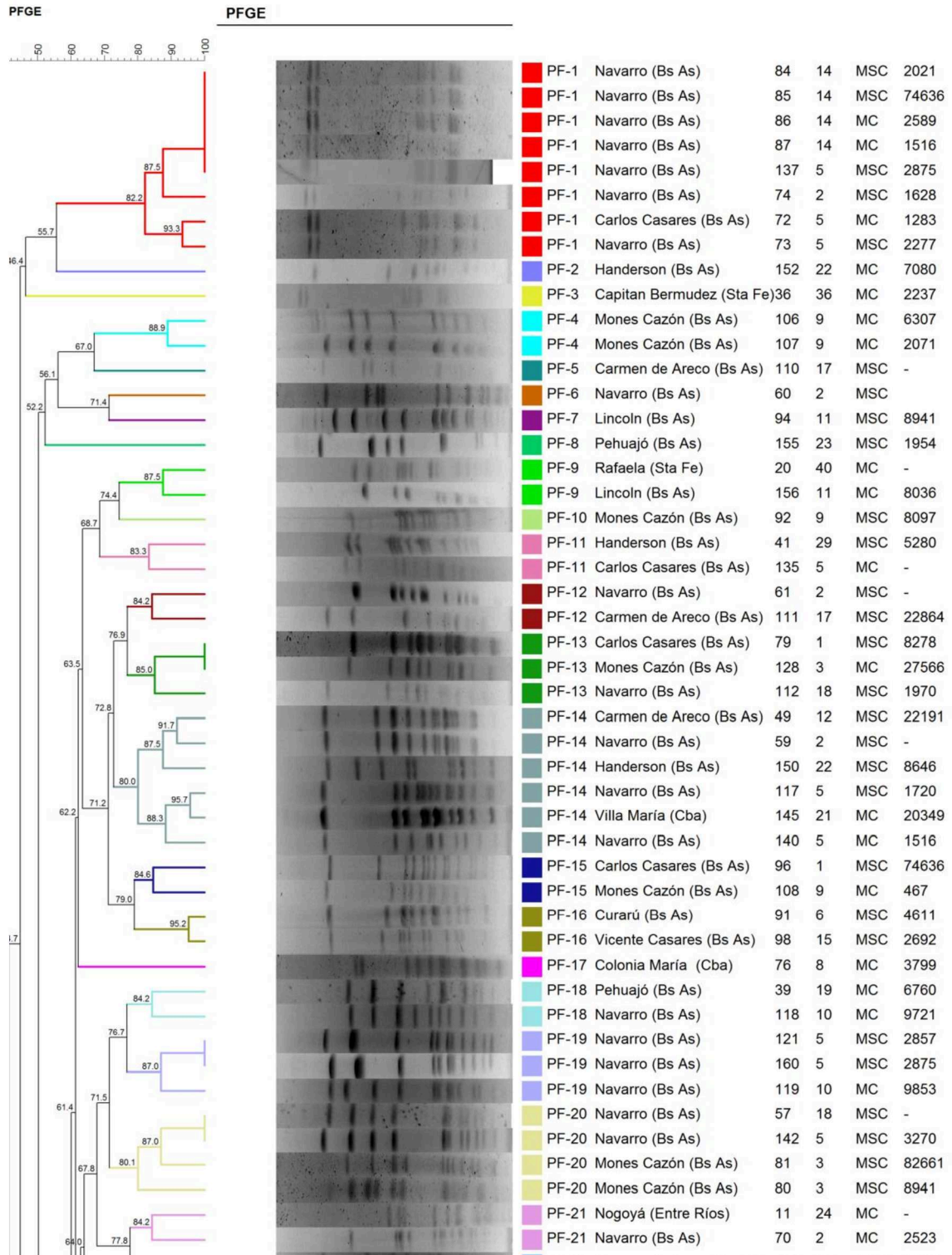
1.1 Resultados de la marcha Bioquímica para caracterizar *S. uberis*

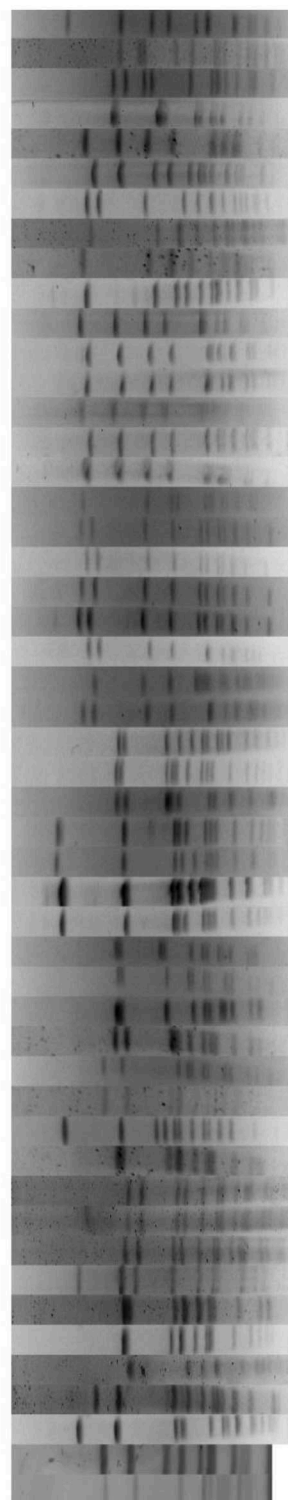
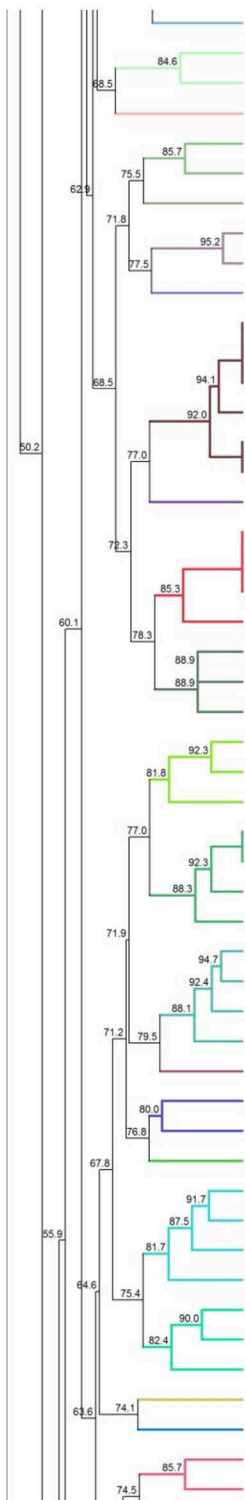
Patógeno	PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
	Hidrolisis de esculina	CAMP	ABE	Crecimiento en NaCl ₂	Hidrolisis de hipurato de Sodio
<i>S. agalactiae</i>	-	+			+
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	+/-	-	-
<i>S. uberis</i>	+	+/-	-	-	+
<i>Streptococcus spp</i>	+		+/-	+/-	-
<i>Enterococcus</i>	+	-	+	+	+

Tabla.1. Muestra los resultados de diferentes pruebas bioquímica de identificación para diferentes microorganismo, en celeste se resalta los resultados para el caso de *S. uberis*.

1.2 Dendrograma obtenida mediante análisis UPGAMA con la metodología PFGE y RAPD-PCR

Para una visualización y análisis de los clones obtenidos con ambas metodología (PFGE y RAPD-PCR) se rconstruyeron dendrograma considerando un 1,5 % de optimización y 1% de tolerancia, los resultados obtenido para ambas metodologías se observan en las Figuras 1 y 2, respectivamente. A la izquierda de la imagen se observa el dendrograma propiamente dicho, y cada color representa un clon diferente, considerando como punto de corte un 80 % de similitud. Seguido, de izquierda a derecha se observan las corridas electroforéticas de cada aislamiento, la localidad de origen, el número de aislamiento, el campo de origen, el tipo de mastitis y finalmente el número de animal.





PF-22	Carmen de Areco (Bs As)	122	12	MSC	19350
PF-23	Navarro (Bs As)	78	10	MC	9711
PF-23	Navarro (Bs As)	116	5	MC	2721
PF-24	Vicente Casares (Bs As)	104	16	MC	3951
PF-25	Handerson (Bs As)	42	29	MSC	19277
PF-25	Vicente Casares (Bs As)	101	16	MC	3842
PF-26	Navarro (Bs As)	171	14	MSC	1950
PF-27	Carmen de Areco (Bs As)	50	12	MSC	22107
PF-27	Navarro (Bs As)	58	2	MSC	-
PF-28	Pehuajó (Bs As)	154	23	MSC	2743
PF-29	Vicente Casares (Bs As)	100	15	MC	3032
PF-29	Vicente Casares (Bs As)	167	16	MC	3927
PF-29	Vicente Casares (Bs As)	170	25	MSC	3032
PF-29	Vicente Casares (Bs As)	102	16	MC	3927
PF-29	Carlos Casares (Bs As)	67	1	MSC	81836
PF-29	Carlos Casares (Bs As)	131	9	MC	1012
PF-30	Handerson (Bs As)	151	22	MSC	6919
PF-31	Navarro (Bs As)	124	5	MSC	2465
PF-31	Rivadavia (Bs As)	125	27	MC	2768
PF-31	Mones Cazón (Bs As)	130	3	MC	3228
PF-31	Mones Cazón (Bs As)	126	3	MC	26725
PF-32	Villa María (Cba)	147	21	MC	4207
PF-32	Handerson (Bs As)	149	22	MSC	5070
PF-32	Villa María (Cba)	148	21	MC	8056
PF-33	Vicente Casares (Bs As)	165	16	MC	3764
PF-33	Vicente Casares (Bs As)	175	15	MC	2684
PF-33	Villa María (Cba)	146	21	MC	6606
PF-34	Navarro (Bs As)	139	5	MC	1516
PF-34	Navarro (Bs As)	143	5	MSC	3672
PF-34	Navarro (Bs As)	158	5	MSC	3000
PF-34	Navarro (Bs As)	161	5	MSC	1516
PF-35	Navarro (Bs As)	127	5	MC	1516
PF-35	Carlos Casares (Bs As)	133	20	MC	1217
PF-35	Navarro (Bs As)	144	5	MSC	2691
PF-35	Brandsen (Bs As)	65	32	MSC	-
PF-36	Carlos Casares (Bs As)	132	20	MC	1211
PF-37	Pehuajó (Bs As)	38	19	MC	6580
PF-37	Saliquelló (Sta Fe)	40	28	MSC	-
PF-38	Navarro (Bs As)	69	2	MC	824
PF-39	Handerson (Bs As)	44	29	MSC	5342
PF-39	Navarro (Bs As)	45	2	MSC	3209
PF-39	Pehuajó (Bs As)	51	23	MC	480
PF-39	Carmen de Areco (Bs As)	95	12	MSC	22246
PF-40	Navarro (Bs As)	54	18	MSC	-
PF-40	Navarro (Bs As)	159	5	MSC	2103
PF-40	Corral de Busto (Cba)	48	30	MSC	7978
PF-41	Mones Cazón (Bs As)	83	3	MSC	2084
PF-42	Pehuajó (Bs As)	153	23	MSC	1979
PF-43	Vicente Casares (Bs As)	166	16	MC	3907
PF-43	Vicente Casares (Bs As)	169	25	MSC	3466

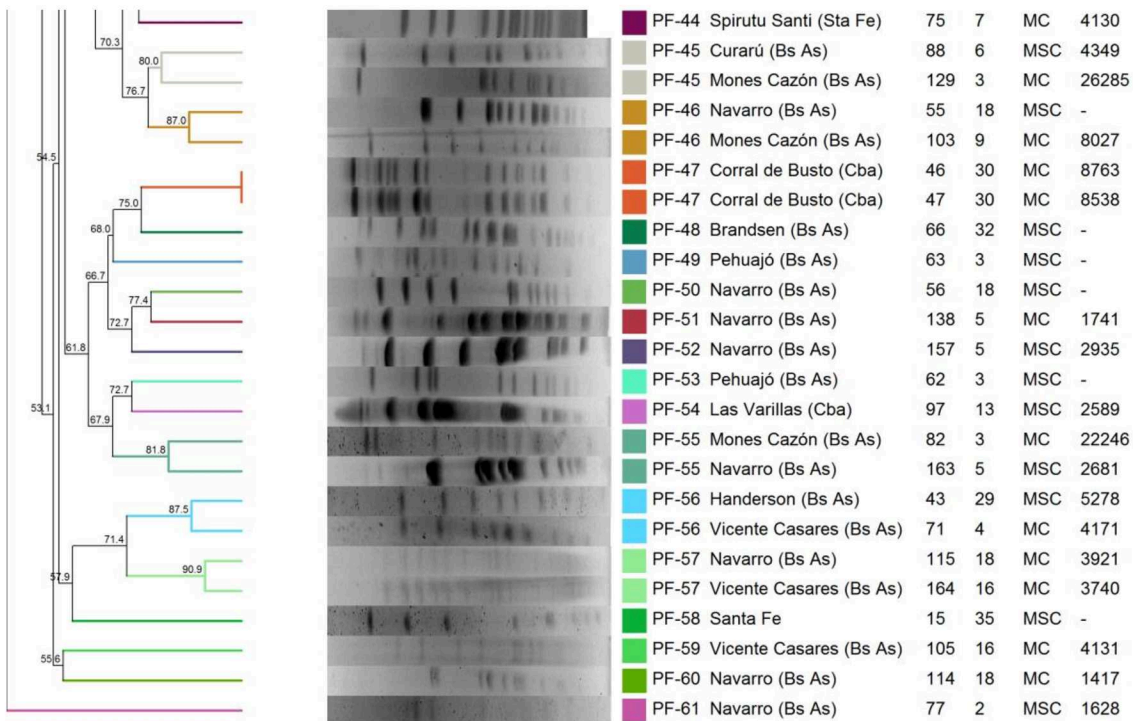
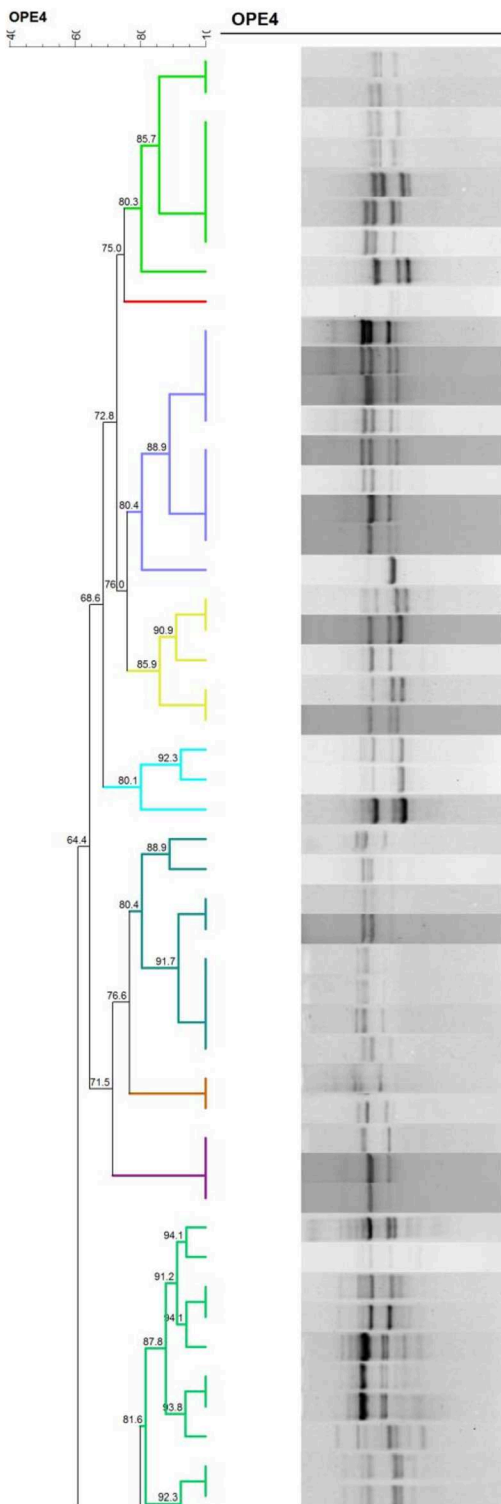
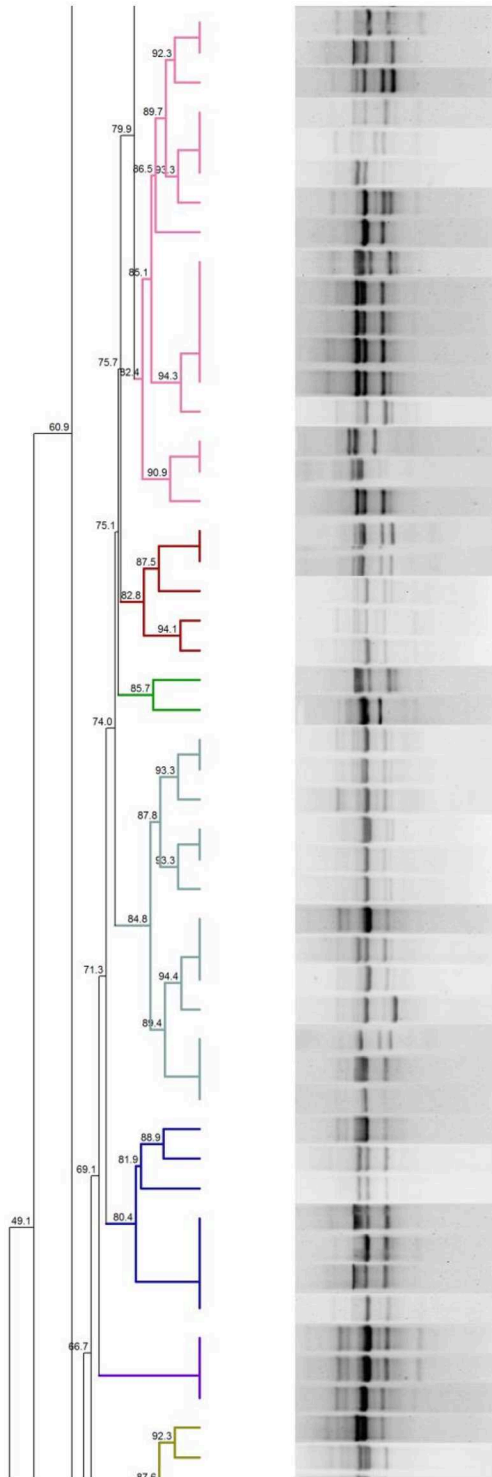


Figura.1. Dendrograma obtenido para el análisis de PFGE.



RD-1	Handerson (Bs As)	41	29	MSC	5280
RD-1	Navarro (Bs As)	73	5	MSC	2277
RD-1	Rafaela (Santa Fe)	20	40	MC	-
RD-1	Handerson (Bs As)	44	29	MSC	5342
RD-1	Carlos Casares (Bs As)	72	5	MSC	1283
RD-1	Navarro (Bs As)	84	14	MSC	2021
RD-1	Vicente Casares (Bs As)	165	16	MC	3764
RD-1	Handerson (Bs As)	43	29	MSC	5278
RD-2	Mones Cazón (Bs As)	90	3	MC	-
RD-3	Carlos Casares (Bs As)	132	20	MC	1211
RD-3	Navarro (Bs As)	140	5	MC	1516
RD-3	Handerson (Bs As)	150	22	MSC	8646
RD-3	Navarro (Bs As)	161	5	MSC	1516
RD-3	Navarro (Bs As)	114	18	MC	1417
RD-3	Navarro (Bs As)	162	5	MSC	2681
RD-3	Navarro (Bs As)	116	5	MSC	2721
RD-3	Navarro (Bs As)	137	5	MC	2875
RD-3	Navarro (Bs As)	78	10	MC	CAU
RD-4	Corral de Busto (Cba)	46	30	MC	8763
RD-4	Navarro (Bs As)	134	20	MC	3672
RD-4	Navarro (Bs As)	158	5	MSC	3000
RD-4	Navarro (Bs As)	74	2	MSC	1628
RD-4	Navarro (Bs As)	112	18	MSC	3590
RD-5	Mones Cazón (Bs As)	83	3	MSC	-
RD-5	Carmen de Areco (Bs As)	96	1	MSC	74.
RD-5	Mones Cazón (Bs As)	82	3	MC	22.
RD-6	Vicente Casares (Bs As)	104	16	MC	3951
RD-6	Handerson (Bs As)	151	22	MSC	6919
RD-6	Mones Cazón (Bs As)	81	3	MSC	82.
RD-6	Vicente Casares (Bs As)	101	16	MC	3842
RD-6	Pehuajó (Bs As)	51	23	MC	-
RD-6	Gral Granada (Bs As)	52	31	MC	-
RD-6	Navarro (Bs As)	58	2	MSC	-
RD-6	Navarro (Bs As)	85	14	MSC	74.
RD-7	Carlos Casares (Bs As)	68	1	MSC	81.
RD-7	Mones Cazón (Bs As)	92	9	MSC	897
RD-8	Navarro (Bs As)	59	2	MSC	-
RD-8	Navarro (Bs As)	142	5	MSC	3270
RD-8	Navarro (Bs As)	172	14	MSC	2950
RD-9	Curarú (Bs As)	91	6	MSC	4611
RD-9	Handerson (Bs As)	149	22	MSC	5070
RD-9	Carmen de Areco (Bs As)	111	17	MC	22.
RD-9	Villa María (Cba)	145	21	MC	20.
RD-9	Pehuajó (Bs As)	62	3	MSC	-
RD-9	Pehuajó (Bs As)	63	3	MSC	-
RD-9	Carlos Casares (Bs As)	67	1	MSC	81.
RD-9	Mones Cazón (Bs As)	128	5	MC	27.
RD-9	Carlos Casares (Bs As)	79	1	MSC	8278
RD-9	Mones Cazón (Bs As)	80	3	MSC	8941



RD-10 Carmen de Areco (Bs As)	49	12	MSC	
RD-10 Navarro (Bs As)	118	10	MC	9721
RD-10 Carlos Casares (Bs As)	135	5	MC	-
RD-10 Navarro (Bs As)	119	10	MC	9853
RD-10 Pehuajó (Bs As)	155	23	MSC	1954
RD-10 Lincoln (Bs As)	156	11	MC	8036
RD-10 Vicente Casares (Bs As)	98	15	MSC	2692
RD-10 Navarro (Bs As)	138	5	MC	1714
RD-10 Corral de Busto (Cba)	47	30	MC	8538
RD-10 Carlos Casares (Bs As)	131	9	MC	1012
RD-10 Carlos Casares (Bs As)	133	20	MC	1217
RD-10 Navarro (Bs As)	141	5	MSC	2465
RD-10 Navarro (Bs As)	143	5	MSC	3672
RD-10 Pehuajó (Bs As)	153	23	MSC	1979
RD-10 Brandsen (Bs As)	65	32	MSC	-
RD-10 Vicente Casares (Bs As)	102	16	MC	3927
RD-10 Navarro (Bs As)	144	5	MSC	2691
RD-11 Navarro (Bs As)	89	5	MC	2875
RD-11 Mones Cazón (Bs As)	93	9	MSC	8278
RD-11 Navarro (Bs As)	55	18	MSC	-
RD-11 Pehuajó (Bs As)	64	3	MSC	-
RD-11 Vicente Casares (Bs As)	169	25	MC	3466
RD-12 Corral de Busto (Cba)	48	30	MSC	
RD-12 Carmen de Areco (Bs As)	50	12	MSC	-
RD-13 Handerson (Bs As)	152	22	MC	7080
RD-13 Pehuajó (Bs As)	154	23	MSC	2743
RD-13 Navarro (Bs As)	160	5	MSC	2875
RD-13 Vicente Casares (Bs As)	168	16	MC	2838
RD-13 Vicente Casares (Bs As)	175	15	MC	2684
RD-13 Navarro (Bs As)	171	14	MSC	1950
RD-13 Navarro (Bs As)	124	5	MSC	2465
RD-13 Navarro (Bs As)	159	5	MSC	2103
RD-13 Vicente Casares (Bs As)	164	16	MC	3740
RD-13 Navarro (Bs As)	157	5	MSC	2935
RD-13 Mones Cazón (Bs As)	103	9	MC	8027
RD-13 Vicente Casares (Bs As)	105	16	MC	4131
RD-13 Mones Cazón (Bs As)	126	3	MC	26
RD-14 Navarro (Bs As)	117	5	MSC	1720
RD-14 Navarro (Bs As)	163	5	MSC	2465
RD-14 Las Varillas (Cba)	146	21	MC	6606
RD-14 Navarro (Bs As)	60	2	MSC	
RD-14 Las Varillas (Cba)	97	13	MSC	2589
RD-14 Navarro (Bs As)	115	18	MC	3921
RD-14 Carmen de Areco (Bs As)	122	12	MSC	19
RD-15 Rivadavia (Bs As)	123	27	MSC	8768
RD-15 Rivadavia (Bs As)	125	27	MC	2768
RD-15 Mones Cazón (Bs As)	130	3	MC	3228
RD-16 Vicente Casares (Bs As)	100	15	MC	332
RD-16 Villa María (Cba)	147	21	MC	4207

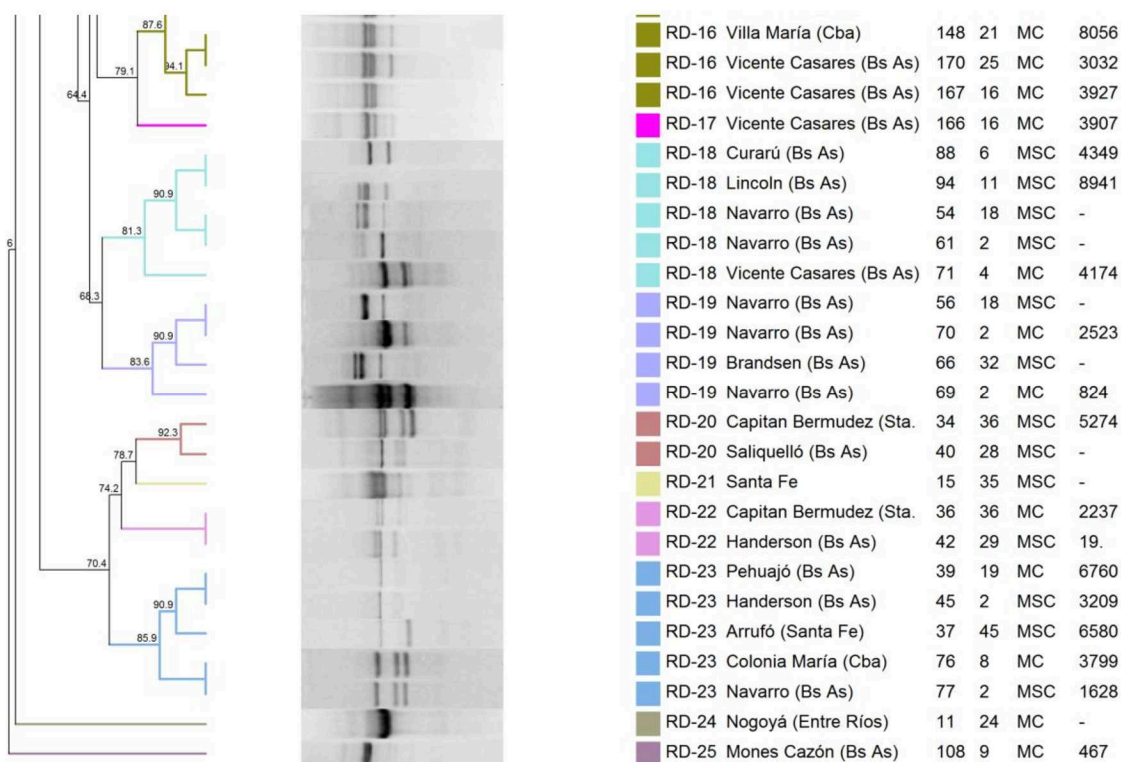


Figura.2. Dendrograma obtenido para el análisis de RAPD-PCR

1.3 Características de los aislamientos de *S. uberis* analizados

	Tipo PFGE	Aislado	Localidad-Provincia	Tipo de Mastitis	Campo de origen	pauA	sua
RD-24	PF-21	SU11	Nogoyá - Entre Ríos	MC	24	+	+
RD-21	PF-58	SU15	Santa Fe	MSC	35	+	+
RD-1	PF-9	SU20	Rafaela -Santa Fe	MC	40	+	+
RD-20	NT	SU34	Capitan Bermudez -Santa Fe	MSC	36	+	+
RD-22	PF-3	SU36	Capitan Bermudez -Santa Fe	MSC	36	+	+
RD-23	NT	SU37	Arrufó - Santa Fe	MSC	45	+	+
NT	PF-37	SU38	Pehuajó -Bs As	MC	19	+	+
RD-23	PF-18	SU39	Pehuajó -Bs As	MC	19	+	+
RD-20	PF-37	SU40	Saliquelló - Bs As	MC	28	+	+
RD-1	PF-11	SU41	Handerson -Bs As	MSC	29	+	+
RD-22	PF-25	SU42	Handerson -Bs As	MSC	29	+	+
RD-1	PF-56	SU43	Handerson -Bs As	MSC	29	+	+

RD-1	PF-39	SU44	Handerson -Bs As	MSC	2	+	+
RD-23	PF-39	SU45	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
RD-4	PF-47	SU46	Corral de Busto –Cba	MC	30	+	+
RD-10	PF-47	SU47	Corral de Busto –Cba	MC	30	+	+
RD-12	PF-40	SU48	Corral de Busto –Cba	MSC	30	+	+
RD-10	PF-14	SU49	Carmen de Areco- Bs As	MSC	12	+	+
RD-12	PF-27	SU50	Carmen de Areco- Bs As	MSC	12	+	+
RD-6	PF-39	SU51	Pehuajó -Bs As	MC	23	+	+
RD-6	NT	SU52	General granada -Bs As	MC	31	+	+
RD-18	PF-40	SU54	Navarro - Bs As	MSC	18	+	+
RD-11	PF-46	SU55	Navarro - Bs As	MSC	18	+	+
RD-19	PF-50	SU56	Navarro - Bs As	MSC	18	+	+
NT	PF-20	SU57	Navarro - Bs As	MSC	18	+	+
RD-6	PF-27	SU58	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
RD-8	PF-14	SU59	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
RD-14	PF-6	SU60	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
RD-18	PF-12	SU61	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
RD-9	PF-53	SU62	Pehuajó -Bs As	MSC	34	+	+
RD-9	PF-49	SU63	Pehuajó -Bs As	MSC	3	+	+
RD-11	NT	SU64	Pehuajó -Bs As	MSC	3	+	+
RD-10	PF-35	SU65	Brandsen - Bs As	MSC	32	+	+
RD-19	PF-48	SU66	Brandsen - Bs As	MSC	32	+	+
RD-9	PF-29	SU67	Carlos Casares - Bs As	MSC	1	+	+
RD-7	NT	SU68	Carlos Casares - Bs As	MSC	1	+	+
RD-19	PF-38	SU69	Navarro - Bs As	MC	28	+	+
RD-19	PF-21	SU70	Navarro - Bs As	MC	2	+	+
RD-18	PF-56	SU71	Vicente Casares - Bs As	MC	4	+	+
RD-1	PF-1	SU72	Carlos Casares - Bs As	MC	5	+	+
RD-1	PF-1	SU73	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-4	PF-1	SU74	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
NT	PF-44	SU75	Spiritu Santi - Sta Fe	MC	7	+	+
RD-23	PF-17	SU76	Colonia María –Cba	MC	8	+	+
RD-23	PF-61	SU77	Navarro - Bs As	MSC	2	+	+
RD-3	PF-23	SU78	Navarro - Bs As	MC	10	+	+
RD-9	PF-13	SU79	Carlos Casares - Bs As	MSC	1	+	+
RD-9	PF-20	SU80	Mones Cazón - Bs As	MSC	3	+	+
RD-6	PF-20	SU81	Mones Cazón - Bs As	MSC	3	+	+
RD-5	PF-55	SU82	Mones Cazón - Bs As	MC	3	+	+
RD-5	PF-41	SU83	Mones Cazón - Bs As	MSC	3	+	+
RD-1	PF-1	SU84	Navarro - Bs As	MSC	14	+	+
RD-6	PF-1	SU85	Navarro - Bs As	MSC	14	+	+
NT	PF-1	SU86	Navarro - Bs As	MC	14	+	+

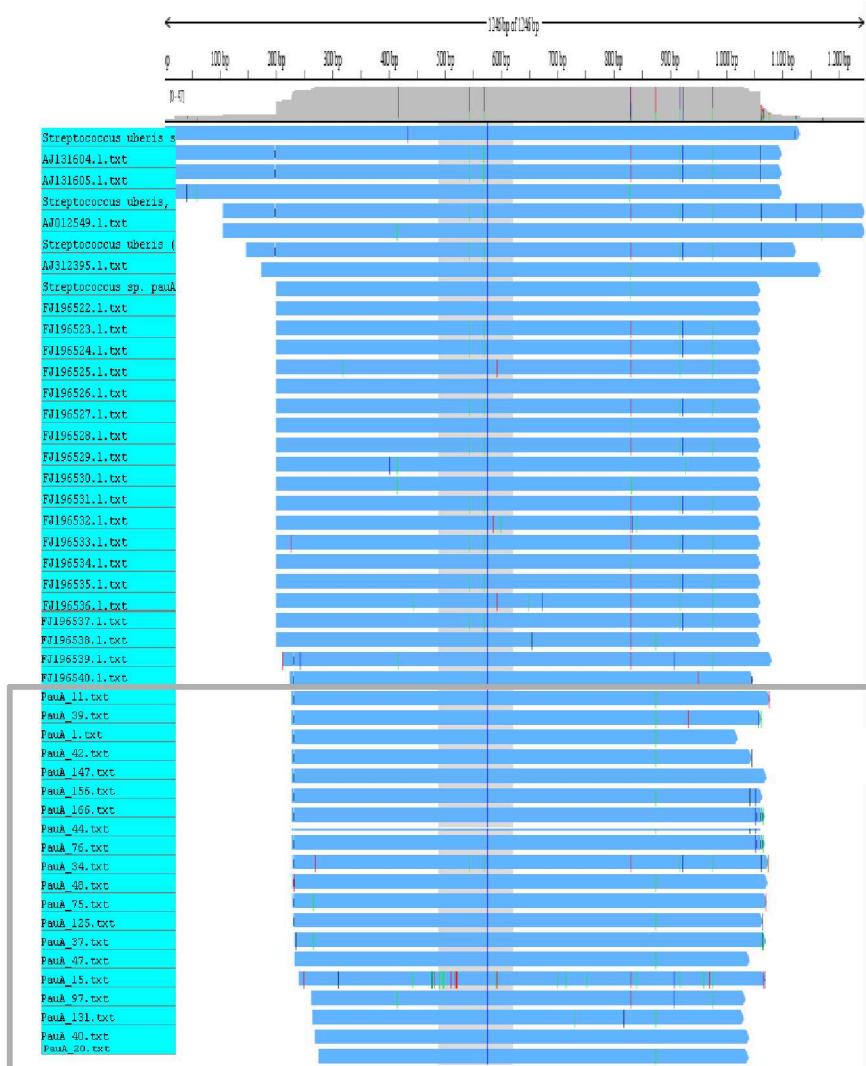
NT	PF-1	SU87	Navarro - Bs As	MC	14	+	+
RD-18	PF-45	SU88	Curarú -Bs As	MSC	6	+	+
RD-11	NT	SU89	Navarro - Bs As	S/D	5	+	+
RD-2	NT	SU90	Mones Cazón - Bs As	MC	3	+	+
RD-9	PF-16	SU91	Curarú -Bs As	MSC	6	+	+
RD-7	PF-10	SU92	Mones Cazón - Bs As	MSC	9	+	+
RD-11	NT	SU93	Mones Cazón - Bs As	MSC	9	+	+
RD-18	PF-7	SU94	Linclon -Bs As	MSC	11	+	+
NT	PF-39	SU95	Carmen de Areco- Bs As	MSC	12	+	+
RD-5	PF-15	SU96	Carlos Casares - Bs As	MSC	1	+	+
RD-14	PF-54	SU97	Las Varillas – Cba	MSC	13	+	+
RD-10	PF-16	SU98	Vicente Casares - Bs As	MSC	15	+	+
RD-16	PF-29	SU100	Vicente Casares - Bs As	MC	15	+	+
RD-6	PF-25	SU101	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
RD-10	PF-29	SU102	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
RD-13	PF-46	SU103	Mones Cazón - Bs As	MC	9	+	+
RD-6	PF-24	SU104	Vicente Casares - Bs As	MC	16	-	-
RD-13	PF-59	SU105	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
NT	PF-4	SU106	Mones Cazón - Bs As	MC	9	-	-
NT	PF-4	SU107	Mones Cazón - Bs As	MC	9	-	+
RD-25	PF-15	SU108	Mones Cazón - Bs As	MC	9	+	+
NT	NT	SU109	Carlos Casares - Bs As	MSC	1	+	+
NT	PF-5	SU110	Carmen de Areco- Bs As	MSC	17	+	+
RD-9	PF-12	SU111	Carmen de Areco- Bs As	MSC	17	+	-
RD-4	PF-13	SU112	Navarro - Bs As	MSC	18	+	+
RD-3	PF-60	SU114	Navarro - Bs As	MC	18	+	+
RD-14	PF-57	SU115	Navarro - Bs As	MC	18	+	+
RD-3	PF-23	SU116	Navarro - Bs As	MC	5	+	+
RD-14	PF-14	SU117	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-10	PF-18	SU118	Navarro - Bs As	MC	10	+	+
RD-10	PF-19	SU119	Navarro - Bs As	MC	10	+	+
NT	PF-19	SU121	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-14	PF-22	SU122	Carmen de Areco- Bs As	MSC	12	+	+
RD-15	NT	SU123	Rivadavia - Bs As	MSC	27	+	+
RD-13	PF-31	SU124	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-15	PF-31	SU125	Rivadavia - Bs As	MC	27	+	+
RD-13	PF-31	SU126	Mones Cazón - Bs As	MC	3	-	+
NT	PF-35	SU127	Navarro - Bs As	MC	5	+	+
RD-9	PF-13	SU128	Mones Cazón - Bs As	MC	3	+	+
RD-9	PF-45	SU129	Mones Cazón - Bs As	MC	3	+	+
RD-15	PF-31	SU130	Mones Cazón - Bs As	MC	3	+	+
RD-10	PF-29	SU131	Carlos Casares - Bs As	MC	56	+	+

RD-3	PF-36	SU132	Carlos Casares - Bs As	MC	26	+	+
RD-10	PF-35	SU133	Carlos Casares - Bs As	MSC	26	+	+
RD-4	NT	SU134	Navarro - Bs As	S/D	20	+	+
RD-10	PF-11	SU135	Carlos Casares - Bs As	MC	55	+	+
RD-3	PF-1	SU137	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-10	PF-51	SU138	Navarro - Bs As	MC	5	+	+
NT	PF-34	SU139	Navarro - Bs As	MC	5	-	+
RD-3	PF-14	SU140	Navarro - Bs As	MC	5	-	+
RD-10	NT	SU141	Navarro - Bs As	MSC	20	+	+
RD-8	PF-20	SU142	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-10	PF-34	SU143	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-10	PF-35	SU144	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-9	PF-14	SU145	Villa María – Cba	MC	21	+	+
RD-14	PF-33	SU146	Villa María – Cba	MC	21	+	+
RD-16	PF-32	SU147	Villa María – Cba	MC	21	+	+
RD-16	PF-32	SU148	Villa María – Cba	MC	21	+	+
RD-9	PF-32	SU149	Handerson -Bs As	MSC	22	+	+
RD-3	PF-14	SU150	Handerson -Bs As	MSC	22	+	+
RD-6	PF-30	SU151	Handerson -Bs As	MSC	22	+	+
RD-13	PF-2	SU152	Handerson -Bs As	MC	22	+	+
RD-10	PF-42	SU153	Pehuajó -Bs As	MSC	23	+	+
RD-13	PF-28	SU154	Pehuajó -Bs As	MSC	23	+	+
RD-10	PF-8	SU155	Pehuajó -Bs As	MSC	23	+	+
RD-10	PF-9	SU156	Linclon -Bs As	MC	11	+	+
RD-13	PF-52	SU157	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-4	PF-34	SU158	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-13	PF-40	SU159	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-13	PF-19	SU160	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-3	PF-34	SU161	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-3	NT	SU162	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-14	PF-55	SU163	Navarro - Bs As	MSC	5	+	+
RD-13	PF-57	SU164	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
RD-1	PF-33	SU165	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
RD-17	PF-43	SU166	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
RD-16	PF-29	SU167	Vicente Casares - Bs As	MC	16	+	+
RD-13	NT	SU168	Vicente Casares - Bs As	MC	16	-	+
RD-11	PF-43	SU169	Vicente Casares - Bs As	MSC	25	+	+
RD-16	PF-29	SU170	Vicente Casares - Bs As	MSC	25	+	+
RD-13	PF-26	SU171	Navarro - Bs As	MSC	14	+	+
RD-8	NT	SU172	Navarro - Bs As	MSC	14	+	+
RD-13	PF-33	SU175	Vicente Casares - Bs As	MC	15	+	+

Tabla.2. MSC: Mastitis Subclínica, MC: Mastitis Clínica, S/D: Sin datos disponible.
(+): Presencia del gen, (-): Ausencia del gen. En azul se destacan los aislamientos seleccionados para analizar el polimorfismo de secuencias de factores de virulencia, donde se tuvo en cuenta la región geográfica y la relación clonal entre aislamientos.

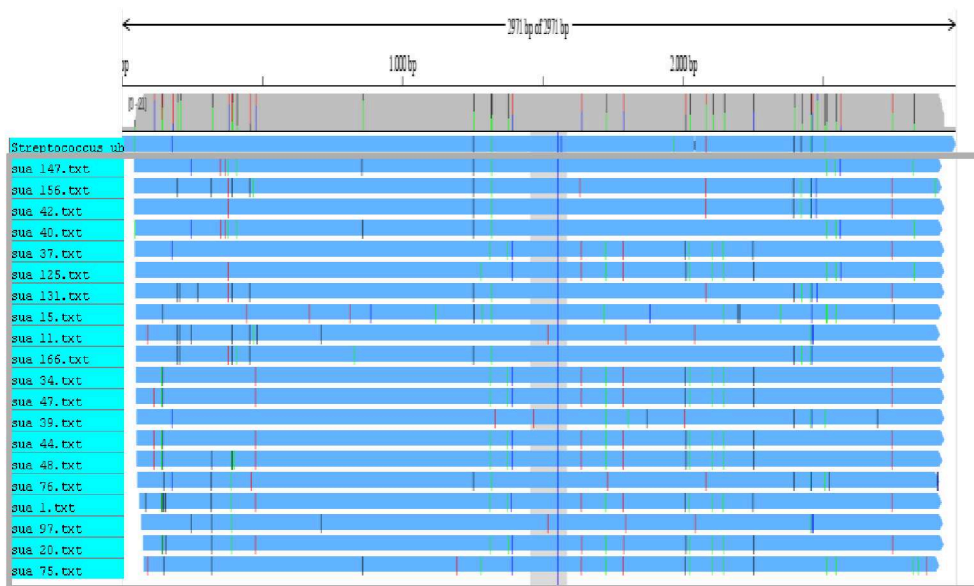
1.4 Alineamientos de secuencias nucleotídicas del gen codificante del activador de plasminógeno de *S. uberis* (PauA).

Esquema del alineamiento realizado con el software CodonCodeAligner, entre 20 secuencias seleccionadas de diferentes regiones de Argentina (resaltadas en recuadro gris) y las secuencias indexadas en la base de datos GenBank, entre las cuales se encuentran de Nueva Zelanda, Estados Unidos, Inglaterra y Australia.



1.5 Alineamientos de secuencias nucleotídicas del gen codificante de la molécula de adhesión de *Streptococcus uberis*.

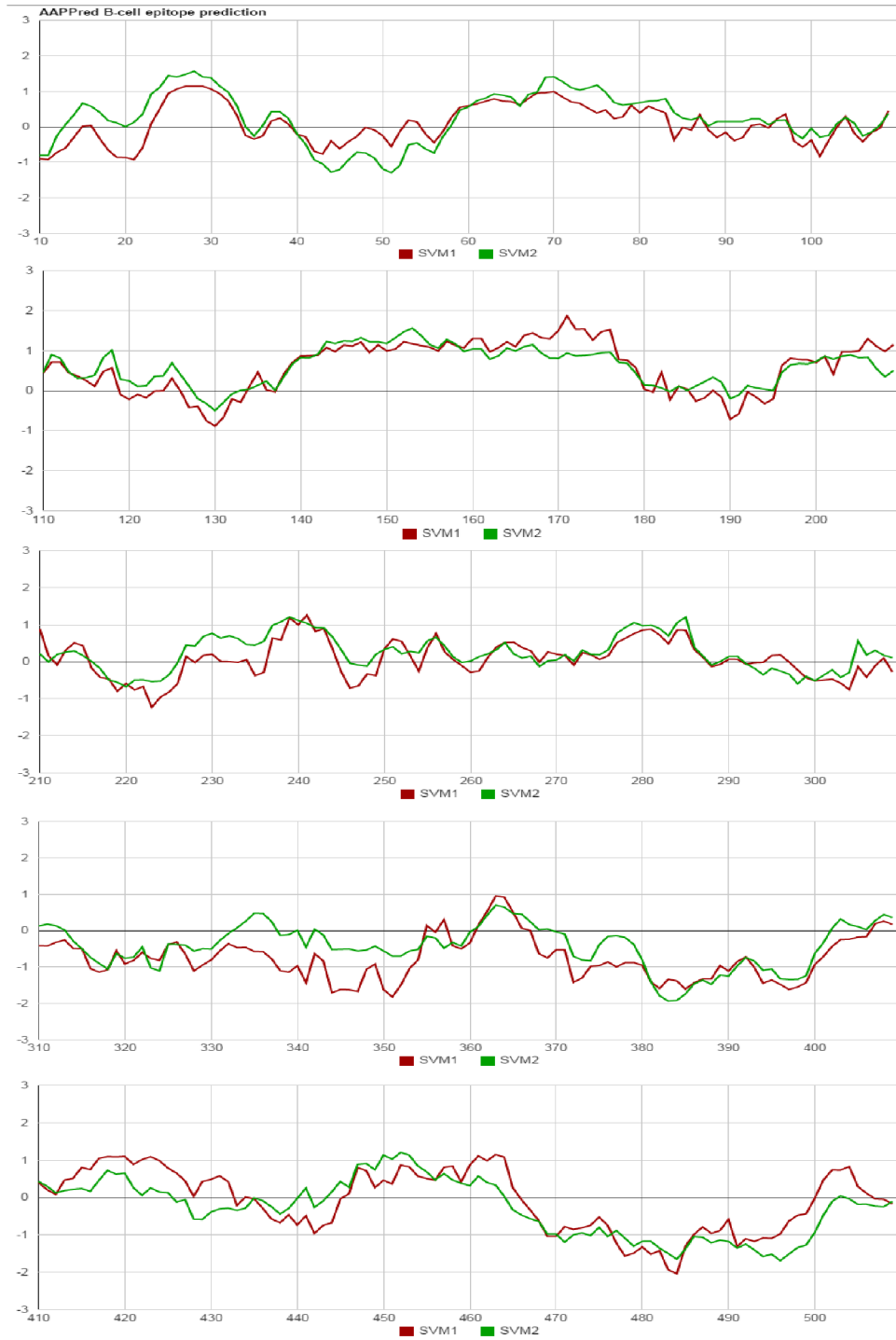
Esquema del alineamiento realizado con el software CodoCodeAligner, entre 20 secuencias seleccionadas de diferentes regiones de Argentina (resaltadas en recuadro gris) y las secuencias indexadas en la base de datos GenBank, del gen sua de un aislamiento de Estados Unidos.



2. Material complementario Capítulo III

2.1 Evaluación de antigenicidad mediante AAppred

Se observa en el eje X el número de aminoácido de la secuencia de SUAM, mientras que en el eje Y se representan los scores para SMV1 (■) y SMV2 (■), donde SMV1 representa el análisis basado en frecuencias de pares de aminoácidos (AAP) y escalas clásicas como hidrofobicidad, flexibilidad, etc. SVM2 utiliza sólo frecuencias de AAP para la predicción de epítopes.





2.2 Alineamientos de secuencias de proteínas clonadas

El alineamiento de las secuencias codificantes de SUAM-fr se realizó con el gen codificante de la molécula de adhesión de *S. uberis* (sua) disponible en GenBank: gbIDQ232760.11, de la cepa *Streptococcus uberis* UT888. Mientras que el alineamiento de las secuencia de PauAr se realizó con la secuencia codificante del gen del Activador de

Sbjct	1117	 GAAGTTGGGGCATACTTAAATCATTACGTTGATATCGCAAGTGACTTAAACCGTATCGTT	176
Query	61	AACCCAGATAACTTATCAGTTGAGGTTCAAAATGAATTGGCTGTATTTGCAGCAACATTG	120
Sbjct	1177	 AACCCAGATAACTTATCAGTTGAGGTTCAAAATGAATTGGCTGTATTTGCAGCAACATTG	236
Query	121	ATTAATTCTGTTTCGTCAGCAATTTGGTCTTTCTGCAGTCGAAGTGACACAAGGTGCTCAA	180
Sbjct	1237	ATTAATTCTGTTTCGTCAGCAATTTGGTCTTTCTGCAGTCGAAGTGACGCAAGGTGCTCAA	296
Query	181	GAGTTTGCTCGCACTTTGACTCAAAACTATAAAGCAACACATGGAAACTGTTCCCTTTC	240
Sbjct	1297	 GAGTTTGCTCGCACTTTGACTCAAAACTATAAAGCAACACATGGAAACTGTTCCCTTTC	356
Query	241	TTTAATTACAATCAACCTGGCAAGAATGGTCATATAGGCATTGGTCCACACGATAGAACA	300
Sbjct	1357	 TTTAATTACAATCAACCTGGCAAGAATGGTCATATAGGCATTGGTCCACACGATAGAACA	416
Query	301	ATTATCGAACCAAGCAGCTACAAGTGTGGCTTAAAAGCTAATGATGATAACATGTATGAA	360
Sbjct	1417	 ATTATCGAACCAAGCAGCTACAAGTGTGGCTTAAAAGCTAATGATGATAACATGTATGAA	476
Query	361	AACATCGGATTCTTTGATGATGTTCATACTGTTAATGGTATCAAACGTAGTATTTATAAC	420
Sbjct	1477	 AACATCGGATTCTTTGATGATGTTCATACTGTTAATGGTATCAAACGTAGTATTTATAAC	1536
Query	421	AGTATTAAGTACATGCTGTTTACAGACTTCACCTATGGAAATACATTTGGACATACGGGT	480
Sbjct	1537	 AGTATTAAGTACATGCTGTTTACAGACTTCACCTATGGAAATACATTTGGACATACGGTT	1596
Query	481	AAC TTTGTTGCGTTCTGATAAAACCAAACCAAGTGCTCCCGGTCTAT	527
Sbjct	1597	 AAC TTTGTTGCGTTCTGATAAAACCAAACCAAGTGCTCCGGTCTAT	1641

SUAM-4fr

	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	0.0	584/590(99%)	0/590(0%)	Plus/Plus	
Query	6	CCCAAGTGCTCCGGTCTATTTAGGAGTTTCAACAGAAACTGTTGGTGGTTTAAATACCCA	65		
Sbjct	1623	 CCCAAGTGCTCCGGTCTATTTAGGAGTTTCAACAGAAACTGTTGGTGGTTTAAATACCCA	1682		
Query	66	CTATGTTATCTTCCCGGCAAGCAATATTGTAAATCCAAGCCAGTTCAGCAAACAAGTGGT	125		
Sbjct	1683	 CTATGTTATCTTCCCGGCAAGCAATATTGTAAATGCAGCCAGTTCAGCAAACAAGTGGT	1742		
Query	126	TTCAGGTCATTAACAACAGTTGATAACAGTGCTAAAAATTAGCACTCTTCAAGCAAGTAT	185		
Sbjct	1743	 TTCAGGTCATTAACAACAGTTGATAACAGTGCTAAAAATTAGCACTCTTCAAGCAAGTAT	1802		
Query	186	TGCTTCTGTTGAGTCTAAAAATTCAAACCTTACAAAAACGTATTGCAAATATTTCTTCAGA	245		

```

|||||
Sbjct 1803 TGCTTCTGTTGAGTCTAAAAATCAAACCTTACAAAAACGTATTGCAAATATTTCTTCAGA 1862
Query 246 AGCACTAGTTATCTCTGCCAGAGAAAAGTAGATGGTTTAGCTGCAAACTTCAAAAAGC 305
|||||
Sbjct 1863 AGCACTAGTTATCTCTGCACAGAGAAAAGTAGATGGTTTAGCTGCAAACTTCAAAAAGC 1922
Query 306 TGAATCTAACGTTGAAAAAGCAAAAGCTCAACTTCAACAGTTACAAGATTCAAAAAGAAGA 365
|||||
Sbjct 1923 TGAATCTAACGTTGAAAAAGCAAAAGCTCAACTTCAACAGTTAAGATTCAAAAAGAAGA 1982
Query 366 TTTACATAAAACAACTTGCTTTTGCCCTTTCAACTCGTAAGGATTTAAAAGGTCAACTTGA 425
|||||
Sbjct 1983 TTTACATAAAACAACTTGCTTTTGCCCTTTCAACTCGTAAGGATTTAAAAGGTCAACTTGA 2042
Query 426 CGAATCGCTTGTTCACCTAAATCAGTCTAAAAATCTTTTACATAGCTTAGAAGAAAAACA 485
|||||
Sbjct 2043 CGAATCGCTTGTTCACCTAAATCAGTCTAAAAATCTTTTTCATAGCTTAGAAGAAAAACA 2102
Query 486 AAGTCAAGTGGCAAGTCAAATTAACGCTTTGACATTGAAGAAAGCACAACCTTGAAAAAGA 545
|||||
Sbjct 2103 AAGTCAAGTGGCAAGTCAAATTAACGCTTTGACATTGAAGAAAGCACAACCTTGAAAAAGA 2162
Query 546 ACTAGCCTTTAACTCTCATCCAAATCGTGAAAAAGTTGCAAAAAGAAAAAG 595
|||||
Sbjct 2163 ACTAGCCTTTAACTCTCATCCAAATCGTGAAAAAGTTGCAAAAAGAAAAAG 2212

```

PauA

	Expect	Identities	Gaps	Strand
	0.0	702/718(98%)	1/718(0%)	Plus/Plus
Query 7	TTTTTAATATTAATGCCTTTGGGAATATTTGGTTGTGCTACTCAACCATCAAAGGTTGCA			66
Sbjct 13	TTTTTAATATTAATGCCTTTGGGAATATTTGGTTGTGCTACTCAACCATCAAAGGTTGCA			72
Query 67	GCAATAACCGGTTATGATTCCGACTACTACGCTAGATATATTGATCCCGATGAAAATAAA			126
Sbjct 73	GCAATAACCGGTTATGATTCCGACTACTACGCTAGATATATTGATCCCGATGAAAATAAA			132
Query 127	ATAACATTTGCCATAAATGTTGATGGTTTTGTGCGAANGTAGTAATCAAGAAATCCTTATT			186
Sbjct 133	ATAACATTTGCCATAAATGTTGATGGTTTTGTGCGAAGTAGTAATCAAGAAATCCTTATT			192
Query 187	AGAGGAATTCATCATGTTTTAACAGATCAAACCAAAGATTGTTACAAAGGCCGAGTTG			246
Sbjct 193	AGAGGAATTCATCATGTTTTAACAGATCAAACCAAAGATTGTTACAAAGGCCGAGTTG			252
Query 247	TTAGACGCTATTAGACATCAAATGGTTCTTCTACAATTGGATTANTCCTATGAACTAGTC			306
Sbjct 253	TTAGACGCTATTAGACATCAAATGGTTCTTCTACAATTGGATTANTCCTATGAACTAGTC			312
Query 307	GACTTTGCGCCTGATGCACAATTATTAACACGANATCGACGGCTTTTATTTGCCNATCGA			366
Sbjct 313	GACTTTGCGCCTGATGCACAATTATTAACACGANATCGACGGCTTTTATTTGCCNATCGA			372

```

Query 367 AATTTTGGGAANCCGTATCACTTGAAGATACTATTCAAGAATACCTTTTAAAAGGGCAT 426
          |||
Sbjct 373 AATTTTGGGAA■CCGTATCACTTGAAGATACTATTCAAGAATACCTTTTAAAAGGGCAT 432

Query 427 GTTATTCTCAGAAAACGGGTTGAGGAACCTATCACTCATCCTACTGAGACTGCTAATATT 486
          |||
Sbjct 433 GTTATTCTCAGAAAACGGGTTGA■GAACCTATCACTCATCCTACTGAGACTGCTAATATT 492

Query 487 GAGTATAAAGTTCAATTCGCGACTAAAGATGGGGAATTCCACCCACTACCTATTTTGTGTA 546
          |||
Sbjct 493 GAGTATAAAGTTCAATTCGCGACTAAAGATGGGGAATTCCACCCACTACCTATTTTGTGTA 552

Query 547 GACTACGGAGAAAAACATATTGGAGAAAATTAACCTCTGACGAGTTTCGAAAAATTGCA 606
          |||
Sbjct 553 GACTACGGAGAAAAACATATTGGAGAAAATTAACCTCTGACGAGTTTCGAAAAATTGCA 612

Query 607 GAAGAAAAGCTTTTNGCAACTCTACCCTGACTATATGATTGATCannnnnnnnnTACTAT 666
          |||
Sbjct 613 GAAGAAAAGCTTTT■GCAACTCTACCCTGACTATATGATTGATCA■AAAAGAATTACTAT 671
x

Query 667 CATAAACACAATTCTCTGGTCAACTTCCAAGATATTATTCTTATCCAGATGATTC 724
          |||
Sbjct 672 CATAAACACAATTCTCTGGTCAACTTCCAAGATATTATTCTTATCCAGATGATTC 729

```

BIBLIOGRAFIA

- Abureema, S.; Smooker, P.; Malmo, J. y Deighton, M. (2014). "Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain." *J Dairy Sci* **97**(1): 285-290.
- Akers, R. M. y Nickerson, S. C. (2011). "Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**(4): 275-289.
- Almeida, R. A.; Luther, D. A.; Kumar, S. J.; Calvinho, L. F.; Bronze, M. S. y Oliver, S. P. (1996). "Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins." *Zentralbl Veterinarmed B* **43**(7): 385-392.
- Almeida, R. A.; Luther, D. A. y Oliver, S. P. (1999). "Incubation of *Streptococcus uberis* with extracellular matrix proteins enhances adherence to and internalization into bovine mammary epithelial cells." *FEMS Microbiol Lett* **178**(1): 81-85.
- Almeida, R. A.; Luther, D. A.; Park, H. M. y Oliver, S. P. (2006a). "Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM)." *Vet Microbiol* **115**(1-3): 183-191.
- Almeida, R. A.; Luther, D. A.; Patel, D. y Oliver, S. P. (2011). "Predicted antigenic regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM) are involved in adherence to and internalization into mammary epithelial cells." *Vet Microbiol* **148**(2-4): 323-328.
- Almeida, R. A. y Oliver, S. P. (1993). "Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*." *Zentralbl Veterinarmed B* **40**(9-10): 707-714.
- Almeida, R. A. y Oliver, S. P. (2001). "Role of collagen in adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **48**(10): 759-763.

- Almeida, R. A. y Oliver, S. P. (2006b). "Trafficking of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells." *Microb Pathog* **41**(2-3): 80-89.
- Alva-Murillo, N.; Tellez-Perez, A. D.; Sagrero-Cisneros, E.; Lopez-Meza, J. E. y Ochoa-Zarzosa, A. (2012). "Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells." *Cell Immunol* **280**(1): 108-112.
- Alluwaimi, A. M. (2004). "The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy." *Res Vet Sci* **77**(3): 211-222.
- Anderson, J. C. (1978). "The problem of immunization against staphylococcal mastitis." *Br Vet J* **134**(5): 412-420.
- Babashamsi, M.; Hossein Razavian, M. y Reza Nejadmoghadda, M. (2009). "Production and purification of streptokinase by protected affinity chromatography." *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* **1**: 47-51.
- Bannerman, D. D.; Paape, M. J.; Goff, J. P.; Kimura, K.; Lippolis, J. D. y Hope, J. C. (2004). "Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*." *Vet Res* **35**(6): 681-700.
- Baravalle, C.; Dallard, B. E.; Cadoche, M. C.; Pereyra, E. A.; Neder, V. E.; Ortega, H. H. y Calvino, L. F. (2011). "Proinflammatory cytokines and CD14 expression in mammary tissue of cows following intramammary inoculation of *Panax ginseng* at drying off." *Vet Immunol Immunopathol* **144**(1-2): 52-60.
- Baravalle, C.; Dallard, B. E.; Ortega, H. H.; Neder, V. E.; Canavesio, V. R. y Calvino, L. F. (2010). "Effect of *Panax ginseng* on cytokine expression in bovine mammary glands at drying off." *Vet Immunol Immunopathol* **138**(3): 224-230.
- Barber, M. R.; Pantschenko, A. G.; Hinckley, L. S. y Yang, T. J. (1999). "Inducible and constitutive in vitro neutrophil chemokine expression by mammary epithelial and myoepithelial cells." *Clin Diagn Lab Immunol* **6**(6): 791-798.
- Barkema, H. W.; Deluyker, H. A.; Schukken, Y. H. y Lam, T. J. (1999). "Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving." *Prev Vet Med* **38**(1): 1-9.

- Barrio, M. B.; Rainard, P.; Gilbert, F. B. y Poutrel, B. (2003). "Assessment of the opsonic activity of purified bovine sIgA following intramammary immunization of cows with *Staphylococcus aureus*." *J Dairy Sci* **86**(9): 2884-2894.
- Baumrucker, C. R.; Burkett, A. M.; Magliaro-Macrina, A. L. y Dechow, C. D. (2010). "Colostrogenesis: mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum." *J Dairy Sci* **93**(7): 3031-3038.
- Beachey, E. H. (1981). "Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface." *J Infect Dis* **143**(3): 325-345.
- Bedolla, C. P. d. L., MER (2008). "Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera." *REDVET* **IX**(4): 1695-7504.
- Berlutti, F.; Pantanella, F.; Natalizi, T.; Frioni, A.; Paesano, R.; Polimeni, A. y Valenti, P. (2011). "Antiviral properties of lactoferrin a natural immunity molecule." *Molecules* **16**(8): 6992-7018.
- Bertona, D.; Bontempi, I.; Veaute, C. M.; Calvino, L. F.; Marcipar, I. S.; Nicastro, A. y Pujato, N. (2013). "Desarrollo de partículas altamente inmunoestimulantes para la formulación de vacunas veterinarias de bajo costo." VI Jornada y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Casilda, Rosario, Santa Fe, Argentina. 27 al 29 de noviembre de 2013.
- Bomford, R. (1980). "The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. I. Effect on the antibody response to bovine serum albumin and sheep red blood cells of Freund's incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, muramyl dipeptide and saponin." *Clin Exp Immunol* **39**(2): 426-434.
- Bontempi, I.; Cabrera, G.; Vicco, M.; Bertona, D.; Villar, S.; Gonzalez, F.; Pujato, N.; Nicastro, A.; Perez, A. R. y Marcipar, I. (2014). Immune protection against *Trypanosoma cruzi* infection: Efficacy of two new generation adjuvants to formulate a subunit vaccine with Tran-Sialidase antigen. . Sociedad Argentina de Inmunología, Mar del Plata. 19 al 22 de Noviembre. pag 136.

- Brito, L. A. y O'Hagan, D. T. (2014). "Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants." *J Control Release* **190**: 563-579.
- Brown, W. C.; Rice-Ficht, A. C. y Estes, D. M. (1998). "Bovine type 1 and type 2 responses." *Vet Immunol Immunopathol* **63**(1-2): 45-55.
- Bruno, D. R.; Rossitto, P. V.; Bruno, R. G.; Blanchard, M. T.; Sitt, T.; Yeargan, B. V.; Smith, W. L.; Cullor, J. S. y Stott, J. L. (2010). "Differential levels of mRNA transcripts encoding immunologic mediators in mammary gland secretions from dairy cows with subclinical environmental Streptococci infections." *Vet Immunol Immunopathol* **138**(1-2): 15-24.
- Burton, J. L. y Erskine, R. J. (2003). "Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **19**(1): 1-45, v.
- Butler, J. E. (1983). "Bovine immunoglobulins: an augmented review." *Vet Immunol Immunopathol* **4**(1-2): 43-152.
- Calvinho, L. F. (2005). *Estreptococos ambientales causantes de mastitis bovina. Jornada Técnica de Actualización en Mastitis. Montevideo, Uruguay.*
- Calvinho, L. F.; Canavesio, V. R.; Iguzquiza, I. A.; Marioni, I.; Puricelli, F. G.; Neder, V. E.; Tarabla, H. D. y Aubagna, M. D. (2007). "Intramammary infections during the periparturient period in Argentine dairy heifers." *Rev Argent Microbiol* **39**(2): 84-89.
- Calvinho, L. F. y Oliver, S. P. (1998). "Invasion and persistence of Streptococcus dysgalactiae within bovine mammary epithelial cells." *J Dairy Sci* **81**(3): 678-686.
- Camussone, C. M. (2014). *Desarrollo de un inmunógeno prototípico para el control de mastitis bovinas causadas por Staphylococcus aureus. PhD, Universidad Nacional del Litoral.*
- Camussone, C. M.; Pujato, N.; Renna, M. S.; Veaute, C. M.; Morein, B.; Marcipar, I. S. y Calvinho, L. F. (2014a). "Immune response and functional role of antibodies raised in heifers against a Staphylococcus aureus CP5 lysate and recombinant antigens vaccine formulated with Iscom Matrix adjuvant." *Vet Immunol Immunopathol* **162**(3-4): 96-107.

- Camussone, C. M.; Signorini, M.; Galarza, R.; Rejf, P.; Marcipar, I. S. y Calvinho, L. F. (2010). "Respuesta inmune humoral contra una bacterina de *S. aureus* CP5 en vaquillonas empleando dos vías de inoculación." *Rev FAVE. Sec Cs. Vet.* **9**: 50-57.
- Camussone, C. M.; Veaute, C. M.; Pujato, N.; Morein, B.; Marcipar, I. S. y Calvinho, L. F. (2014b). "Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell and lysate vaccine formulated with ISCOM Matrix adjuvant." *Res Vet Sci* **96**(1): 86-94.
- Cañas Bermudez, O; Quijano Parra, A y F., A. R. L. (2006). "Activación y cinética comparativa de dos especies de plasminógenos: Humano y Bovino." *BISTUA* **4**(2): 3-12.
- Capuco, A. V.; Mein, G. A.; Nickerson, S. C.; Jack, L. J.; Wood, D. L.; Bright, S. A.; Aschenbrenner, R. A.; Miller, R. H. y Bitman, J. (1994). "Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis." *J Dairy Sci* **77**(1): 64-74.
- Carrico, J. A.; Silva-Costa, C.; Melo-Cristino, J.; Pinto, F. R.; de Lencastre, H.; Almeida, J. S. y Ramirez, M. (2006). "Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*." *J Clin Microbiol* **44**(7): 2524-2532.
- Coffey, T. J.; Pullinger, G. D.; Urwin, R.; Jolley, K. A.; Wilson, S. M.; Maiden, M. C. y Leigh, J. A. (2006). "First insights into the evolution of *Streptococcus uberis*: a multilocus sequence typing scheme that enables investigation of its population biology." *Appl Environ Microbiol* **72**(2): 1420-1428.
- Comoy, E. E.; Capron, A. y Thyphronitis, G. (1997). "In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens." *Int Immunol* **9**(4): 523-531.
- Compton, C. W.; Heuer, C.; Parker, K. y McDougall, S. (2007). "Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity." *J Dairy Sci* **90**(9): 4157-4170.
- Cooray, R. y Bjorck, L. (1995). "Bactericidal activity of the bovine myeloperoxidase system against bacteria associated with mastitis." *Vet Microbiol* **46**(4): 427-434.

- Correia, B. E.; Bates, J. T.; Loomis, R. J.; Baneyx, G.; Carrico, C.; Jardine, J. G.; Rupert, P.; Correnti, C.; Kalyuzhniy, O.; Vittal, V.; Connell, M. J.; Stevens, E.; Schroeter, A.; Chen, M.; Macpherson, S.; Serra, A.; M.Adachi, Y.; Holmes, M. A.; Li, Y.; Klevit, R. E.; Gaham, B. S.; Wyatt, R. T.; Aker, D. S., R. K.; Cowe, J. E., Jr.; Jon, P. R. y Shief, W. R. (2014). "Proof of principle for epitope-focused vaccine design." *Nature* **507**(7491): 201-206.
- Costa, J. G.; Faccendini, P. L.; Sferco, S. J.; Lagier, C. M. y Marcipar, I. S. (2013). "Evaluation and comparison of the ability of online available prediction programs to predict true linear B-cell epitopes." *Protein Pept Lett* **20**(6): 724-730.
- Covacci, A.; Censini, S.; Bugnoli, M.; Petracca, R.; Burroni, D.; Macchia, G.; Massone, A.; Papini, E.; Xiang, Z. y Figura, N. (1993). "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(12): 5791-5795.
- Chaneton, L.; Tirante, L.; Maito, J.; Chaves, J. y Bussmann, L. E. (2008). "Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland." *J Dairy Sci* **91**(5): 1865-1873.
- Chaves, C. J. (2009). "Calidad de leche y mastitis bovina " Curso: Sistemas de producción lechera de argentina y Cuba.
- Chen, R. (2012). "Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond." *Biotechnol Adv* **30**(5): 1102-1107.
- Chen, X.; Dego, O. K.; Almeida, R. A.; Fuller, T. E.; Luther, D. A. y Oliver, S. P. (2011). "Deletion of sua gene reduces the ability of *Streptococcus uberis* to adhere to and internalize into bovine mammary epithelial cells." *Vet Microbiol* **147**(3-4): 426-434.
- Chevallet, M.; Luche, S. y Rabilloud, T. (2006). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." *Nat Protoc* **1**(4): 1852-1858.
- Dallard, B. E.; Baravalle, C.; Andreotti, C.; Ortega, H. H.; Neder, V. y Calvinho, L. F. (2011). "Intramammary inoculation of *Panax ginseng* extract in cows at drying off enhances early mammary involution." *J Dairy Res* **78**(1): 63-71.

- de Greeff, A.; Zadoks, R.; Ruuls, L.; Toussaint, M.; Nguyen, T. K.; Downing, A.; Rebel, J.; Stockhofe-Zurwieden, N. y Smith, H. (2013). "Early host response in the mammary gland after experimental *Streptococcus uberis* challenge in heifers." *J Dairy Sci* **96**(6): 3723-3736.
- De Gregorio, E.; Caproni, E. y Ulmer, J. B. (2013). "Vaccine adjuvants: mode of action." *Front Immunol* **4**: 214.
- De Vliegher, S.; Barkema, H. W.; Stryhn, H.; Opsomer, G. y de Kruif, A. (2005). "Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation." *J Dairy Sci* **88**(3): 938-947.
- De Vliegher, S.; Fox, L. K.; Piepers, S.; McDougall, S. y Barkema, H. W. (2012). "Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control." *J Dairy Sci* **95**(3): 1025-1040.
- De Vliegher, S.; Pierpers, S.; Supre, K. y Barkema, H. M. (2008). "Matitis in dairy herifers." III congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Recife: CCS Grafica e Editoria **1**: 351-373.
- Deb, R.; Kumar, A.; Chakraborty, S.; Verma, A. K.; Tiwari, R.; Dhama, K.; Singh, U. y Kumar, S. (2013). "Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review." *Pak J Biol Sci* **16**(23): 1653-1661.
- Denis, M.; Lacy-Hulbert, S. J.; Buddle, B. M.; Williamson, J. H. y Wedlock, D. N. (2011). "*Streptococcus uberis*-specific T cells are present in mammary gland secretions of cows and can be activated to kill *S. uberis*." *Vet Res Commun* **35**(3): 145-156.
- Denis, M.; Parlane, N. A.; Lacy-Hulbert, S. J.; Summers, E. L.; Buddle, B. M. y Wedlock, D. N. (2006). "Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows." *Vet Immunol Immunopathol* **114**(1-2): 111-120.
- Deutsch, D. G. y Mertz, E. T. (1970). "Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography." *Science* **170**(3962): 1095-1096.

- Dohoo, I. R. y Leslie, K. E. (1991). "Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections." *Preventive Veterinary Medicine* **10**(3): 225-237.
- Douglas, V. L.; Fenwick, S. G.; Pfeiffer, D. U.; Williamson, N. B. y Holmes, C. W. (2000). "Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis." *Vet Microbiol* **75**(1): 27-41.
- Dufour, S. y Dohoo, I. R. (2013). "Short communication: relationship between herd intramammary infection incidence and elimination rate during the dry period." *J Dairy Sci* **96**(3): 1672-1676.
- Dulin, A. M.; Paape, M. J. y Nickerson, S. C. (1988). "Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows." *Am J Vet Res* **49**(2): 172-177.
- Egan, S. A.; Kurian, D.; Ward, P. N.; Hunt, L. y Leigh, J. A. (2010). "Identification of sortase A (SrtA) substrates in *Streptococcus uberis*: evidence for an additional hexapeptide (LPXXXD) sorting motif." *J Proteome Res* **9**(2): 1088-1095.
- Egan, S. A.; Ward, P. N.; Watson, M.; Field, T. R. y Leigh, J. A. (2012). "Vru (Sub0144) controls expression of proven and putative virulence determinants and alters the ability of *Streptococcus uberis* to cause disease in dairy cattle." *Microbiology* **158**(Pt 6): 1581-1592.
- Ellison, R. T., 3rd; Giehl, T. J. y LaForce, F. M. (1988). "Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin." *Infect Immun* **56**(11): 2774-2781.
- Erskine, R. J.; Eberhart, R. J.; Hutchinson, L. J.; Spencer, S. B. y Campbell, M. A. (1988). "Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts." *J Am Vet Med Assoc* **192**(6): 761-765.
- Estes, D. M. (1996). "Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression." *Vet Immunol Immunopathol* **54**(1-4): 61-67.
- Estes, D. M. y Brown, W. C. (2002). "Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle." *Vet Immunol Immunopathol* **90**(1-2): 1-10.

- Ezzat Alnakip, M.; Quintela-Baluja, M.; Böhme, K.; Fernández-No, I.; Caamaño-Antelo, S.; Calo-Mata, P. y Barros-Velázquez, J. (2014). "The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions." *Journal of Veterinary Medicine* **2014**(65980).
- Facklam, R. (2002). "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes." *Clin Microbiol Rev* **15**(4): 613-630.
- Fang, W.; Almeida, R. A. y Oliver, S. P. (2000). "Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells." *Am J Vet Res* **61**(3): 275-279.
- Fang, W y Oliver, S. P. (1999). "Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*." *FEMS Microbiol Lett* **176**(1): 91-96.
- FASS (1999). " Federation of Animal Sciences Societies." *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Federation of Animal Sciences Societies, Champaign, Illinois, EE.UU.*
- Feikova, S. y Klement, C. (2007). "[Pulsed-field gel electrophoresis and its practical use]." *Klin Mikrobiol Infekc Lek* **13**(6): 236-241.
- Filippsen, L. F.; Valentin-Weigand, P.; Blobel, H.; Preissner, K. T. y Chhatwal, G. S. (1990). "Role of complement S protein (vitronectin) in adherence of *Streptococcus dysgalactiae* to bovine epithelial cells." *Am J Vet Res* **51**(6): 861-865.
- Finch, J. M.; Hill, A. W.; Field, T. R. y Leigh, J. A. (1994). "Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain." *Infect Immun* **62**(9): 3599-3603.
- Finch, J. M.; Winter, A.; Walton, A. W. y Leigh, J. A. (1997). "Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis*." *Vaccine* **15**(10): 1138-1143.
- Fitzpatrick, J. L.; Cripps, P. J.; Hill, A. W.; Bland, P. W. y Stokes, C. R. (1992). "MHC class II expression in the bovine mammary gland." *Vet Immunol Immunopathol* **32**(1-2): 13-23.

- Fontaine, M. C.; Perez-Casal, J.; Song, X. M.; Shelford, J.; Willson, P. J. y Potter, A. A. (2002). "Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge." *Vaccine* **20**(17-18): 2278-2286.
- Fox, L. K. (2009). "Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis." *Vet Microbiol* **134**(1-2): 82-88.
- Fox, S.; Leitch, A. E.; Duffin, R.; Haslett, C. y Rossi, A. G. (2010). "Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease." *J Innate Immun* **2**(3): 216-227.
- Gallego, F. J. y Martínez, I. (1997). "Method to improve reliability of random-amplified polymorphic DNA markers." *Biotechniques* **23**(4): 663-664.
- García, J.; Santana, Z.; Zumalacárregui, L.; Quintana, M.; González, D.; Furrázola, G. y Cruz, O. (2013). "Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*." *VacciMonitor* **22**((2)): 30-39.
- Garçon, N.; Morel, S.; Didierlaurent, A.; Descamps, D.; Wettendorff, M. y Van Mechelen, M. (2011). "Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach." *BioDrugs* **25**(4): 217-226.
- Garçon, N.; Roels, G. L. y Cheng, W. F. (2011). "Vaccine adjuvants." *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology* **1**(1): 89-113.
- Gilbert, F. B.; Luther, D. A. y Oliver, S. P. (1997). "Induction of surface-associated proteins of *Streptococcus uberis* by cultivation with extracellular matrix components and bovine mammary epithelial cells." *FEMS Microbiol Lett* **156**(1): 161-164.
- Gillespie, B. E.; Jayarao, B. M.; Pankey, J. W. y Oliver, S. P. (1998). "Subtyping of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions by DNA fingerprinting." *Zentralbl Veterinarmed B* **45**(10): 585-593.
- Gillespie BE, J. B., Pankey JW y Oliver SP. (1998). "Subtyping of *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions by DNA fingerprinting." *Zentralbl Veterinarmed B*. **45**(10): 585-593.

- Gillespie, B. E. y Oliver, S. P. (2004). "Comparison of an Automated Ribotyping System, Pulsed-field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting for Differentiation of *Streptococcus uberis* Strains." *Biotechnology* **3**(2): 165-172.
- Glenny, A. T.; Buttle, G. A. H. y Stevens, M. F. (1931). " Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum." *J. Pathol. Bacteriol.*, **34**(267-275).
- Glenny, A. T. y Pope, C. G. (1925). "The antigenic effect of intravenous injection of diphtheria toxin." *J. Pathol. Bacteriol.* **28**: 273-278.
- Goering, R. V. (2010). "Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease." *Infect Genet Evol* **10**(7): 866-875.
- Goldberg, G. I.; Frisch, S. M.; He, C.; Wilhelm, S. M.; Reich, R. y Collier, I. E. (1990). "Secreted proteases. Regulation of their activity and their possible role in metastasis." *Ann N Y Acad Sci* **580**: 375-384.
- Gordillo, M. E.; Singh, K. V.; Baker, C. J. y Murray, B. E. (1993). "Typing of group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis." *J Clin Microbiol* **31**(6): 1430-1434.
- Grant, R. G. y Finch, J. M. (1996). "Phagocytosis of *Streptococcus uberis* by bovine mammary gland macrophages." *Research in Veterinary Science* **62**: 74-78.
- Grinberg, N.; Elazar, S.; Rosenshine, I. y Shpigel, N. Y. (2008). "Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*." *Infect Immun* **76**(6): 2802-2807.
- Grohn, Y. T.; Wilson, D. J.; Gonzalez, R. N.; Hertl, J. A.; Schulte, H.; Bennett, G. y Schukken, Y. H. (2004). "Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows." *J Dairy Sci* **87**(10): 3358-3374.
- Groschup, M. H.; Hahn, G. y Timoney, J. F. (1991). "Antigenic and genetic homogeneity of *Streptococcus uberis* strains from the bovine udder." *Epidemiol Infect* **107**(2): 297-310.

- Guidry, A. J.; Paape, M. J. y Pearson, R. E. (1980). "Effect of udder inflammation on milk immunoglobulins and phagocytosis." *Am J Vet Res* **41**(5): 751-753.
- Guzman, E.; Price, S.; Poulosom, H. y Hope, J. (2012). "Bovine gammadelta T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity." *Vet Immunol Immunopathol* **148**(1-2): 161-167.
- Harmon, R. J. (1994). "Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts." *J Dairy Sci* **77**(7): 2103-2112.
- Harmon, R. J.; Schanbacher, F. L.; Ferguson, L. C. y Smith, K. L. (1976). "Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows." *Infect Immun* **13**(2): 533-542.
- Hasty, D. L.; Ofek, I.; Courtney, H. S. y Doyle, R. J. (1992). "Multiple adhesins of streptococci." *Infect Immun* **60**(6): 2147-2152.
- Hayashi, K.; Nakazawa, M.; Ishizaki, Y.; Hiraoka, N. y Obayashi, A. (1986). "Regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol." *Nucleic Acids Res* **14**(19): 7617-7631.
- Heinrichs, A. J.; Costello, S. S. y Jones, C. M. (2009). "Control of heifer mastitis by nutrition." *Vet Microbiol* **134**(1-2): 172-176.
- Hettinga, K.; van Valenberg, H.; de Vries, S.; Boeren, S.; van Hooijdonk, T.; van Arendonk, J. y Vervoort, J. (2011). "The host defense proteome of human and bovine milk." *PLoS One* **6**(4): e19433.
- Hill, A. W. (1988). "Protective effect of previous intramammary infection with *Streptococcus uberis* against subsequent clinical mastitis in the cow." *Res Vet Sci* **44**(3): 386-387.
- Hill, A. W. y Leigh, J. A. (1989). "DNA fingerprinting of *Streptococcus uberis*: a useful tool for epidemiology of bovine mastitis." *Epidemiol Infect* **103**(1): 165-171.
- Hogan, J. S.; Smith, K. L.; Weiss, W. P.; Todhunter, D. A. y Schockey, W. L. (1990). "Relationships among vitamin E, selenium, and bovine blood neutrophils." *J Dairy Sci* **73**(9): 2372-2378.

- Hogan, J. S.; Weiss, W. P.; Todhunter, D. A.; Smith, K. L. y Schoenberger, P. S. (1992). "Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E." *J Dairy Sci* **75**(2): 399-405.
- HogenEsch, H. (2002). "Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants." *Vaccine* **20 Suppl 3**: S34-39.
- Hu, S.; Concha, C.; Lin, F. y Persson Waller, K. (2003). "Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle." *Vet Immunol Immunopathol* **91**(1): 29-37.
- Huang, C. J.; Lin, H. y Yang, X. (2012). "Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements." *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**(3): 383-399.
- Hughes, H. P. (1998). "Cytokine adjuvants: lessons from the past--guidelines for the future?" *Vet Immunol Immunopathol* **63**(1-2): 131-138.
- Huynh, H. T.; Robitaille, G. y Turner, J. D. (1991). "Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation." *Exp Cell Res* **197**(2): 191-199.
- I.R. Dohoo, K. E. L. (1991). "Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections." *Preventive Veterinary Medicine* **10**(3): 225-237.
- Iar, Ed. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press: Washington, D.C.
- Isobe, N.; Morimoto, K.; Nakamura, J.; Yamasaki, A. y Yoshimura, Y. (2009). "Intramammary challenge of lipopolysaccharide stimulates secretion of lingual antimicrobial peptide into milk of dairy cows." *J Dairy Sci* **92**(12): 6046-6051.
- Jarzab, A.; Skowicki, M. y Witkowska, D. (2013). "Subunit vaccines antigens, carriers, conjugation methods and the role of adjuvants." *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **67**: 1128-1143.
- Jayarao, B. M.; Dore, J. J., Jr. y Oliver, S. P. (1992). "Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin." *J Clin Microbiol* **30**(9): 2235-2240.

- Jayarao, B. M.; Oliver, S. P.; Tagg, J. R. y Matthews, K. R. (1991). "Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mammary secretions." *Epidemiol Infect* **107**(3): 543-555.
- Jayarao, B. M.; Schilling, E. E. y Oliver, S. P. (1993). "Genomic deoxyribonucleic acid restriction fragment length polymorphism of *Streptococcus uberis*: evidence of clonal diversity." *J Dairy Sci* **76**(2): 468-474.
- Jiang, M.; Babiuk, L. A. y Potter, A. A. (1996). "Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*." *Microb Pathog* **20**(5): 297-307.
- Johnsen, L. B.; Poulsen, K.; Kilian, M. y Petersen, T. E. (1999). "Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*." *Infect Immun* **67**(3): 1072-1078.
- Joksimović Todorović, M. y Davidović, V. (2013). "Immunosuppression – postpartum diseases of dairy cows " *Biotechnology in Animal Husbandry* **29**(2): 211-222.
- Jurgens, D.; Sterzik, B. y Fehrenbach, F. J. (1987). "Unspecific binding of group B streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity." *J Exp Med* **165**(3): 720-732.
- Kawai, K.; Hagiwara, S.; Anri, A. y Nagahata, H. (1999). "Lactoferrin concentration in milk of bovine clinical mastitis." *Vet Res Commun* **23**(7): 391-398.
- Kersten, G. F. y Crommelin, D. J. (1995). "Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations." *Biochim Biophys Acta* **1241**(2): 117-138.
- Kester, H. J.; Sorter, D. E. y Hogan, J. S. (2015). "Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis." *J Dairy Sci* **98**(2): 999-1004.
- Khan, I. U.; Hassan, A. A.; Abdulmawjood, A.; Lammler, C.; Wolter, W. y Zschock, M. (2003). "Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods." *J Vet Sci* **4**(3): 213-224.

- Kitt, A. J. y Leigh, J. A. (1997). "The auxotrophic nature of *Streptococcus uberis*. The acquisition of essential acids from plasmin derived casein peptides." *Adv Exp Med Biol* **418**: 647-650.
- Kromker, V.; Reinecke, F.; Paduch, J. K. y Grabowski, N. (2014). "Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis." *Clin Microbiol* **3**(3).
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lammers, A.; Nuijten, P. J. y Smith, H. E. (1999). "The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells." *FEMS Microbiol Lett* **180**(1): 103-109.
- Lang, P.; Lefebure, T.; Wang, W.; Zadoks, R. N.; Schukken, Y. y Stanhope, M. J. (2009). "Gene content differences across strains of *Streptococcus uberis* identified using oligonucleotide microarray comparative genomic hybridization." *Infect Genet Evol* **9**(2): 179-188.
- Lasagno, M. C.; Reinoso, E. B.; Dieser, S. A.; Calvino, L. F.; Buzzola, F.; Vissio, C.; Bogni, C. I. y Odierno, L. M. (2011). "Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine subclinical mastitis in Argentinean dairy farms." *Rev Argent Microbiol* **43**(3): 212-217.
- Leigh, J. (1993). "Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis*." *FEMS* **144**: 67-72.
- Leigh, J. A. (1994). "Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*." *FEMS Microbiol Lett* **118**(1-2): 153-158.
- Leigh, J. A. (2002). "Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. ." *Vaccine* **20**(25-26): 3047-3048.
- Leigh, J. A.; Egan, S. A.; Ward, P. N.; Field, T. R. y Coffey, T. J. (2010). "Sortase anchored proteins of *Streptococcus uberis* play major roles in the pathogenesis of bovine mastitis in dairy cattle." *Vet Res* **41**(5): 63.

- Leigh, J. A. y Field, T. R. (1994). "Streptococcus uberis resists the bactericidal action of bovine neutrophils despite the presence of bound immunoglobulin." *Infect Immun* **62**(5): 1854-1859.
- Leigh, J. A.; Finch, J. M.; Field, T. R.; Real, N. C.; Winter, A.; Walton, A. W. y Hodgkinson, S. M. (1999). "Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow." *Vaccine* **17**(7-8): 851-857.
- Leigh, J. A.; Hodgkinson, S. M. y Lincoln, R. A. (1998). "The interaction of *Streptococcus dysgalactiae* with plasmin and plasminogen." *Vet Microbiol* **61**(1-2): 121-135.
- Leigh, J. A. y Lincoln, R. A. (1997). "Streptococcus uberis acquires plasmin activity following growth in the presence of bovine plasminogen through the action of its specific plasminogen activator." *FEMS Microbiol Lett* **154**(1): 123-129.
- Leigh, J. A.; Ward, P. N. y Field, T. R. (2004). "The exploitation of the genome in the search for determinants of virulence in *Streptococcus uberis*." *Vet Immunol Immunopathol* **100**(3-4): 145-149.
- Li, W.; Raoult, D. y Fournier, P. E. (2009). "Bacterial strain typing in the genomic era." *FEMS Microbiol Rev* **33**(5): 892-916.
- Lin, Y.; Xia, L.; Turner, J. D. y Zhao, X. (1995). "Morphologic observation of neutrophil diapedesis across bovine mammary gland epithelium in vitro." *Am J Vet Res* **56**(2): 203-207.
- Lincoln, R. A. y Leigh, J. A. (1998). "Characterization of the interaction of bovine plasmin with *Streptococcus uberis*." *J Appl Microbiol* **84**(6): 1104-1110.
- Liu, G. L.; Wang, J. Q.; Bu, D. P.; Cheng, J. B.; Zhang, C. G.; Wei, H. Y.; Zhou, L. Y.; Zhou, Z. F.; Hu, H. y Dong, X. L. (2009). "Factors affecting the transfer of immunoglobulin G1 into the milk of Holstein cows." *Vet J* **182**(1): 79-85.
- Luther, D. A.; Almeida, R. A. y Oliver, S. P. (2008). "Elucidation of the DNA sequence of *Streptococcus uberis* adhesion molecule gene (sua) and detection of sua in strains of *Streptococcus uberis* isolated from geographically diverse locations." *Vet Microbiol* **128**(3-4): 304-312.

- Maeda, Y.; Ohtsuka, H.; Tomioka, M. y Oikawa, M. (2013). "Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows." *Vet Res Commun* **37**(1): 43-49.
- Mallard, B. A.; Dekkers, J. C.; Ireland, M. J.; Leslie, K. E.; Sharif, S.; Vankampen, C. L.; Wagter, L. y Wilkie, B. N. (1998). "Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health." *J Dairy Sci* **81**(2): 585-595.
- Mamo, W.; Froman, G. y Wadstrom, T. (1988). "Interaction of sub-epithelial connective tissue components with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis." *Vet Microbiol* **18**(2): 163-176.
- Mastelic, B.; Ahmed, S.; Egan, W. M.; Del Giudice, G.; Golding, H.; Gust, I.; Neels, P.; Reed, S. G.; Sheets, R. L.; Siegrist, C. A. y Lambert, P. H. (2010). "Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design." *Biologicals* **38**(5): 594-601.
- Matthews, K. R.; Rejman, J. J.; Turner, J. D. y Oliver, S. P. (1994). "Proliferation of a bovine mammary epithelial cell line in the presence of bacterial virulence factors." *J Dairy Sci* **77**(10): 2959-2964.
- Mc Dougall, S.; Arthur, D. G.; Bryan, M. A.; Vermunt, J. J. y Weir, A. M. (2007). "Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics." *N Z Vet J* **55**(4): 161-170.
- Mc Dougall, S.; Parker, K. I.; Heuer, C. y Compton, C. W. (2009). "A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies." *Vet Microbiol* **134**(1-2): 177-185.
- McMichael, J. C. (2000). "Vaccines for *Moraxella catarrhalis*." *Vaccine* **19 Suppl 1**: S101-107.
- McVey, D. S.; Shi, J.; Leigh, J. A.; Rosey, E. L.; Ward, P. N.; Field, T. R. y Yancey, R. J. (2005). "Identification of multiple linear epitopes of the plasminogen activator A (PauA) of *Streptococcus uberis* with murine monoclonal antibodies." *Vet Immunol Immunopathol* **104**(3-4): 155-162.

- Mehrzad, J.; Janssen, D.; Duchateau, L. y Burvenich, C. (2008). "Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland." *J Dairy Sci* **91**(1): 193-201.
- Mehrzad, J.; Paape, M. y Burvenich, C. (2010). "Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows." *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. **11**(No. 2, Ser. No. 31).
- Mensikova, M.; Stepanova, H. y Faldyna, M. (2013). "Interleukin-17 in veterinary animal species and its role in various diseases: a review." *Cytokine* **64**(1): 11-17.
- Menzies, P. I. y Ramanoon, S. Z. (2001). "Mastitis of sheep and goats." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **17**(2): 333-358, vii.
- Miao, J.; Zhang, J.; Zheng, L.; Yu, X.; Zhu, W. y Zou, S. (2012). "Taurine attenuates *Streptococcus uberis*-induced mastitis in rats by increasing T regulatory cells." *Amino Acids* **42**(6): 2417-2428.
- Miller, R. H.; Bitman, J.; Bright, S. A.; Wood, D. L. y Capuco, A. V. (1992). "Effect of clinical and subclinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin." *J Dairy Sci* **75**(6): 1436-1442.
- Molaee, N.; Abtahi, H. y Mosayebi, G. (2013). "Expression of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* and its reaction with infected human and murine sera." *Iran J Basic Med Sci* **16**(9): 985-989.
- Molinari, G.; Rohde, M.; Guzman, C. A. y Chhatwal, G. S. (2000). "Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells." *Cell Microbiol* **2**(2): 145-154.
- Morrissey, J. H. (1981). "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity." *Anal Biochem* **117**(2): 307-310.
- Moshynskyy, I.; Jiang, M.; Fontaine, M. C.; Perez-Casal, J.; Babiuk, L. A. y Potter, A. A. (2003). "Characterization of a bovine lactoferrin binding protein of *Streptococcus uberis*." *Microb Pathog* **35**(5): 203-215.
- Moyes, K. M.; Drackley, J. K.; Morin, D. E.; Bionaz, M.; Rodriguez-Zas, S. L.; Everts, R. E.; Lewin, H. A. y Loor, J. J. (2009). "Gene network and pathway

analysis of bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPAR γ signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism." *BMC Genomics* **10**: 542.

- Mullen, G. E.; Ellis, R. D.; Miura, K.; Malkin, E.; Nolan, C.; Hay, M.; Fay, M. P.; Saul, A.; Zhu, D.; Rausch, K.; Moretz, S.; Zhou, H.; Long, C. A.; Miller, L. H. y Treanor, J. (2008). "Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria." *PLoS One* **3**(8): e2940.
- Nabel, G. J. (2013). "Designing tomorrow's vaccines." *N Engl J Med* **368**(6): 551-560.
- Nickerson, S. C.; Owens, W. E. y Boddie, R. L. (1995). "Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control." *J Dairy Sci* **78**(7): 1607-1618.
- NMC. (2011). "Recommended mastitis control program."
- Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T. y Yoshikawa, M. (2000). "Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants." *Biol Chem* **381**(1): 67-74.
- Odierno, L.; Calvinho, L.; Traversa, P.; Lasagno, M.; Bogni, C. y Reinoso, E. (2006). "Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds." *J Dairy Sci* **89**(10): 3886-3890.
- Olive, D. M. y Bean, P. (1999). "Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms." *J Clin Microbiol* **37**(6): 1661-1669.
- Oliver, S. P.; Almeida, R. A. y Calvinho, L. F. (1998). "Virulence factors of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis." *Zentralbl Veterinarmed B* **45**(8): 461-471.
- Oliver, S. P.; Gonzalez, R. N.; Hogan, J. S.; Jayarao, B. M. y Owens, W. E. (2004a). *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*; Verona, Wisconsin, EE.UU.
- Oliver, S. P.; Gonzalez, R. N.; Hogan, J. S.; Jayarao, B. M. (2004b). "Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and

Determination of Milk Quality;." 4th edition. National Mastitis Council, Verona, Wisconsin, EE.UU.

- Oliver, S. P. y Mitchell, B. A. (1983). "Intramammary infections in primigravid heifers near parturition." *J Dairy Sci* **66**(5): 1180-1183.
- Oliver, S. P. y Sordillo, L. M. (1988). "Udder health in the periparturient period." *J Dairy Sci* **71**(9): 2584-2606.
- Oviedo-Boyso, J.; Valdez-Alarcon, J. J.; Cajero-Juarez, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; Lopez-Meza, J. E.; Bravo-Patino, A. y Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). "Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis." *J Infect* **54**(4): 399-409.
- Paape, M.; Mehrzad, J.; Zhao, X.; Detilleux, J. y Burvenich, C. (2002). "Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**(2): 109-121.
- Paape, M. J.; Bannerman, D. D.; Zhao, X. y Lee, J. W. (2003). "The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk." *Vet Res* **34**(5): 597-627.
- Paape, M. J.; Shafer-Weaver, K.; Capuco, A. V.; Van Oostveldt, K. y Burvenich, C. (2000). "Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells." *Adv Exp Med Biol* **480**: 259-277.
- Pashine, A.; Valiante, N. M. y Ulmer, J. B. (2005). "Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants." *Nat Med* **11**(4 Suppl): S63-68.
- Patel, D.; Almeida, R. A.; Dunlap, J. R. y Oliver, S. P. (2009). "Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells." *Vet Microbiol* **137**(3-4): 297-301.
- Pedersen, L. H.; Aalbaek, B.; Rontved, C. M.; Ingvartsen, K. L.; Sorensen, N. S.; Heegaard, P. M. y Jensen, H. E. (2003). "Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*." *J Comp Pathol* **128**(2-3): 156-164.
- Perez-Casal, J.; Prysliak, T. y Potter, A. A. (2004). "A GapC chimera retains the properties of the *Streptococcus uberis* wild-type GapC protein." *Protein Expr Purif* **33**(2): 288-296.

- Pettersson, A.; Kortekaas, J.; Weynants, V. E.; Voet, P.; Poolman, J. T.; Bos, M. P. y Tommassen, J. (2006). "Vaccine potential of the Neisseria meningitidis lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB." *Vaccine* **24**(17): 3545-3557.
- Piepers, S.; De Vliegher, S.; de Kruif, A.; Opsomer, G. y Barkema, H. W. (2009). "Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling." *Vet Microbiol* **134**(1-2): 113-120.
- Pinzón, J. L. (1989). "Mastitis Bovina - Tipos, Agentes causales y Diagnósticos." FONAIAP DIVULGA **31**.
- Piubelli, L.; Campa, M.; Temporini, C.; Binda, E.; Mangione, F.; Amicosante, M.; Terreni, M.; Marinelli, F. y Pollegioni, L. (2013). "Optimizing Escherichia coli as a protein expression platform to produce Mycobacterium tuberculosis immunogenic proteins." *Microb Cell Fact* **12**: 115.
- Prado, M. E.; Almeida, R. A.; Ozen, C.; Luther, D. A.; Lewis, M. J.; Headrick, S. J. y Oliver, S. P. (2011). "Vaccination of dairy cows with recombinant Streptococcus uberis adhesion molecule induces antibodies that reduce adherence to and internalization of S. uberis into bovine mammary epithelial cells." *Vet Immunol Immunopathol.* **141** (3-4): 201-208.
- Pujato, N.; Carrere, X.; Camussone, C. M.; Calvinho, L. F. y Marcipar, I. S. (2011). "*Obtención de antígenos recombinantes de Staphylococcus aureus y su evaluación como inmunógenos para la formulación de una vacuna multicomponente*". IV Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 1 y 2 de Diciembre.
- Pullinger, G. D.; Lopez-Benavides, M.; Coffey, T. J.; Williamson, J. H.; Cursons, R. T.; Summers, E.; Lacy-Hulbert, J.; Maiden, M. C. y Leigh, J. A. (2006). "Application of Streptococcus uberis multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom." *Appl Environ Microbiol* **72**(2): 1429-1436.
- Rainard, P. (2003). "The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections." *Vet Res* **34**(5): 647-670.

- Rainard, P. y Riollet, C. (2006). "Innate immunity of the bovine mammary gland." *Vet Res* **37**(3): 369-400.
- Rajput, Z. I.; Hu, S. H.; Xiao, C. W. y Arijo, A. G. (2007). "Adjuvant effects of saponins on animal immune responses." *J Zhejiang Univ Sci B* **8**(3): 153-161.
- Rambeaud, M.; Almeida, R. A.; Pighetti, G. M. y Oliver, S. P. (2003). "Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis." *Vet Immunol Immunopathol* **96**(3-4): 193-205.
- Rato, M. G.; Bexiga, R.; Nunes, S. F.; Cavaco, L. M.; Vilela, C. L. y Santos-Sanches, I. (2008a). "Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*." *J Dairy Sci* **91**(12): 4542-4551.
- Rato, M. G.; Bexiga, R.; Nunes, S. F.; Cavaco, L. M.; Vilela, C. L. y Santos-Sanches, I. (2008b). "Molecular Epidemiology and Population Structure of Bovine *Streptococcus uberis*." *J. Dairy Sci.* **91**: 4542–4551.
- Reed, S. G.; Orr, M. T. y Fox, C. B. (2013). "Key roles of adjuvants in modern vaccines." *Nat Med* **19**(12): 1597-1608.
- Reinoso, E.; Gutierrez, P.; lasagno, M.; Tirante, L.; Dieser, S.; Calvinho, L. y Odierno, L. (2008). Caracterización molecular de cepas de *Streptococcus uberis* aisladas de mastitis bovina en la cuenca central de Argentina. V Congreso de Microbiología General. Rosario, Santa Fe.
- Reinoso, E. B.; Lasagno, M. C.; Dieser, S. A. y Odierno, L. M. (2011). "Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis." *FEMS Microbiol Lett* **318**(2): 183-188.
- Rejman, J. J.; Turner, J. D. y Oliver, S. P. (1994). "Characterization of lactoferrin binding to the MAC-T bovine mammary epithelial cell line using a biotin-avidin technique." *Int J Biochem* **26**(2): 201-206.
- Rinaldi, M.; Li, R. W.; Bannerman, D. D.; Daniels, K. M.; Evock-Clover, C.; Silva, M. V.; Paape, M. J.; Van Ryssen, B.; Burvenich, C. y Capuco, A. V. (2010). "A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis." *Funct Integr Genomics* **10**(1): 21-38.

- Riollet, C.; Rainard, P. y Poutrel, B. (2000). "Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland." *Adv Exp Med Biol* **480**: 247-258.
- Rivera, E.; Daggfeldt, A. y Hu, S. (2003a). "Ginseng extract in aluminium hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*." *Vet Immunol Immunopathol* **91**(1): 19-27.
- Rivera, E.; Hu, S. y Concha, C. (2003b). "Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants." *Vaccine* **21**(11-12): 1149-1157.
- Robinson, D. A.; Hollingshead, S. K.; Musser, J. M.; Parkinson, A. J.; Briles, D. E. y Crain, M. J. (1998). "The IS1167 insertion sequence is a phylogenetically informative marker among isolates of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae*." *J Mol Evol* **47**(2): 222-229.
- Rosano, G. L. y Ceccarelli, E. A. (2014). "Recombinant protein expression in microbial systems." *Front Microbiol* **5**: 341.
- Rosey, E. L.; Lincoln, R. A.; Ward, P. N.; Yancey, R. J. J. y Leigh, J. A. (1999). "PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*." *FEMS Microbiol Lett* **178**(1): 27-33.
- Saha, S. y Raghava, G. P. (2006). "Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network." *Proteins* **65**(1): 40-48.
- Schalm, O. W. (1942). "*Streptococcus agalactiae* in the udder of heifers at parturition traced to sucking among calves." *Cornell Veterinary* **32**: 39-60.
- Schalm, O. W., Carroll, E. J., y Jain, N. C. (1971). "Bovine mastitis." In *Bovine mastitis. A symposium.. Philadelphia, USA: Lea & Febiger*.
- Schnaitman, C. A. (1971). "Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100." *J Bacteriol* **108**(1): 545-552.
- Schukken, Y. H.; Wilson, D. J.; Welcome, F.; Garrison-Tikofsky, L. y Gonzalez, R. N. (2003). "Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts." *Vet Res* **34**(5): 579-596.

- Shafer-Weaver, K. A.; Corl, C. M. y Sordillo, L. M. (1999). "Shifts in bovine CD4+ subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period." *J Dairy Sci* **82**(8): 1696-1706.
- Shafer-Weaver, K. A.; Pighetti, G. M. y Sordillo, L. M. (1996). "Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period." *Proc Soc Exp Biol Med* **212**(3): 271-280.
- Shome, B. R. (2012). "Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk." *Tropical Animal Health and Production* **12**(8): 1981-1992.
- Skjold, S. A.; Quie, P. G.; Fries, L. A.; Barnham, M. y Cleary, P. P. (1987). "DNA fingerprinting of *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) as an aid to epidemiological study." *J Infect Dis* **155**(6): 1145-1150.
- Smith, A. J.; Kitt, A. J.; Ward, P. N. y Leigh, J. A. (2002). "Isolation and characterization of a mutant strain of *Streptococcus uberis*, which fails to utilize a plasmin derived beta-casein peptide for the acquisition of methionine." *J Appl Microbiol* **93**(4): 631-639.
- Smith, A. J.; Ward, P. N.; Field, T. R.; Jones, C. L.; Lincoln, R. A. y Leigh, J. A. (2003). "MtuA, a lipoprotein receptor antigen from *Streptococcus uberis*, is responsible for acquisition of manganese during growth in milk and is essential for infection of the lactating bovine mammary gland." *Infect Immun* **71**(9): 4842-4849.
- Smith, K. L. y Hogan, J. S. (1993). "Environmental mastitis." *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **9**(3): 489-498.
- Smith, K. L.; Hogan, J. S. y Todhunter, D. A. (1990). "A method for estimating confidence in the microbiological diagnosis of intramammary infection." *Proceedings Natl. Mastitis Council*. **29**: 76-79.
- Smolenski, G. A.; Wieliczko, R. J.; Pryor, S. M.; Broadhurst, M. K.; Wheeler, T. T. y Haigh, B. J. (2011). "The abundance of milk cathelicidin proteins during bovine mastitis." *Vet Immunol Immunopathol* **143**(1-2): 125-130.
- Sordillo, L. M. (2005). "Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility." *Livestock Production Science* **98**: 89-99.

- Sordillo, L. M. (2011). "New concepts in the causes and control of mastitis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**(4): 271-273.
- Sordillo, L. M.; Kendall, J. T.; Corl, C. M. y Cross, T. H. (2005). "Molecular characterization of a saposin-like protein family member isolated from bovine lymphocytes." *J Dairy Sci* **88**(4): 1378-1390.
- Sordillo, L. M.; Shafer-Weaver, K. y DeRosa, D. (1997). "Immunobiology of the mammary gland." *J Dairy Sci* **80**(8): 1851-1865.
- Sordillo, L. M. y Streicher, K. L. (2002). "Mammary gland immunity and mastitis susceptibility." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**(2): 135-146.
- Soyer, Y.; Alcaine, S. D.; Schoonmaker-Bopp, D. J.; Root, T. P.; Warnick, L. D.; McDonough, P. L.; Dumas, N. B.; Grohn, Y. T. y Wiedmann, M. (2010). "Pulsed-field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates." *Foodborne Pathog Dis* **7**(6): 707-717.
- Spears, J. W. y Weiss, W. P. (2008). "Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows." *Vet J* **176**(1): 70-76.
- Spickler, A. R. y Roth, J. A. (2003). "Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects." *J Vet Intern Med* **17**(3): 273-281.
- Stratton, Y.-W. T. C. W. (2006). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*.
- Sun, J.; Song, X. y Hu, S. (2008). "Ginsenoside Rg1 and aluminum hydroxide synergistically promote immune responses to ovalbumin in BALB/c mice." *Clin Vaccine Immunol* **15**(2): 303-307.
- Swanson, K. M.; Stelwagen, K.; Dobson, J.; Henderson, H. V.; Davis, S. R.; Farr, V. C. y Singh, K. (2009). "Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis* induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model." *J Dairy Sci* **92**(1): 117-129.
- Syer, K. (2010). Interactions between bovine neutrophils and *Streptococcus uberis*, University of Nottingham.
- Tardáguila Morales, J. A. y Abascal, C. G. (1999). "Control de mastitis y producción de leche de alta calidad higio-sanitaria en el ganado ovino lechero de

raza churra" Dpto. de Producción Animal I. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

- Tellez-Perez, A. D.; Alva-Murillo, N.; Ochoa-Zarzosa, A. y Lopez-Meza, J. E. (2012). "Cholecalciferol (vitamin D) differentially regulates antimicrobial peptide expression in bovine mammary epithelial cells: implications during *Staphylococcus aureus* internalization." *Vet Microbiol* **160**(1-2): 91-98.
- Tenover, F. C.; Arbeit, R. D.; Goering, R. V.; Mickelsen, P. A.; Murray, B. E.; Persing, D. H. y Swaminathan, B. (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *J Clin Microbiol* **33**(9): 2233-2239.
- Thomas, L.; Haider, W.; Hill, A. W. y Cook, R. S. (1994). "Pathologic findings of experimentally induced *Streptococcus uberis* infection in the mammary gland of cows." *Am J Vet Res* **55**(12): 1723-1728.
- Thomas, S. y Luxon, B. A. (2013). "Vaccines based on structure-based design provide protection against infectious diseases." *Expert Rev Vaccines* **12**(11): 1301-1311.
- Tiwari, J. G.; Babra, C.; Tiwari, H. K.; Williams, V.; De Wet, S.; Gibson, J.; Paxman, A.; Morgan, E.; Costantino, P.; Sunagar, R.; Isloor, S. y Mukkur, T. (2013). "Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis: An Overview." *Vaccines & Vaccination* **4**(2): 176.
- Todhunter, D. A.; Smith, K. L. y Hogan, J. S. (1995). "Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland." *J Dairy Sci* **78**(11): 2366-2374.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 133-146.
- Turner, P. C.; McLennan, A. G.; Bates, A. D. y White, M. R. H. (2000). "Gene libraries and screening. En: Instant notes in molecular biology." BIOS Scientific Publishers Limited, Liverpool, Reino Unido. (Sección I): p. 143-151.
- Van Belkum, A.; Tassios, P. T.; Dijkshoorn, L.; Haeggman, S.; Cookson, B.; Fry, N. K.; Fussing, V.; Green, J.; Feil, E.; Gerner-Smidt, P.; Brisse, S. y Struelens, M.

- (2007). "Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology." *Clin Microbiol Infect* **13 Suppl 3**: 1-46.
- Van der Strate, B. W.; Beljaars, L.; Molema, G.; Harmsen, M. C. y Meijer, D. K. (2001). "Antiviral activities of lactoferrin." *Antiviral Res* **52**(3): 225-239.
 - Vassalli, J. D.; Sappino, A. P. y Belin, D. (1991). "The plasminogen activator/plasmin system." *J Clin Invest* **88**(4): 1067-1072.
 - Verweij, J. J.; Koets, A. P. y Eisenberg, S. W. (2014). "Effect of continuous milking on immunoglobulin concentrations in bovine colostrum." *Vet Immunol Immunopathol* **160**(3-4): 225-229.
 - Vimont, S.; Mnif, B.; Fevre, C. y Brisse, S. (2008). "Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates." *J Med Microbiol* **57**(Pt 10): 1308-1310.
 - Vissio, C.; Agüero, D. A.; Raspanti, C. G.; Odierno, L. M. y Larriestra, A. J. (2015). "Productive and economic daily losses due to mastitis and its control expenditures in dairy farms in Córdoba, Argentina." *Archivos de Medicina Veterinaria* **47**: In Press.
 - Wang, L.; Chen, W.; Zhang, L. y Zhu, Y. (2013). "Genetic diversity of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with subclinical mastitis in Southern Xinjiang Province, China." *J Gen Appl Microbiol* **59**(4): 287-293.
 - Wang, S. M.; Deighton, M. A.; Capstick, J. A. y Gerraty, N. (1999). "Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis." *Epidemiol Infect* **123**(2): 317-324.
 - Ward, P. N.; Field, T. R.; Ditcham, W. G.; Maguin, E. y Leigh, J. A. (2001). "Identification and disruption of two discrete loci encoding hyaluronic acid capsule biosynthesis genes *hasA*, *hasB*, and *hasC* in *Streptococcus uberis*." *Infect Immun* **69**(1): 392-399.
 - Ward, P. N.; Field, T. R.; Rapier, C. D. y Leigh, J. A. (2003). "The activation of bovine plasminogen by *PauA* is not required for virulence of *Streptococcus uberis*." *Infect Immun* **71**(12): 7193-7196.
-

- Ward, P. N.; Field, T. R.; Rosey, E. L.; Abu-Median, A. B.; Lincoln, R. A. y Leigh, J. A. (2004a). "Complex interactions between bovine plasminogen and streptococcal plasminogen activator PauA." *J Mol Biol* **342**(4): 1101-1114.
- Ward, P. N. y Leigh, J. A. (2002). "Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*." *J Bacteriol* **184**(1): 119-125.
- Ward, P. N. y Leigh, J. A. (2004b). "Genetic analysis of *Streptococcus uberis* plasminogen activators." *Indian J Med Res* **119 Suppl**: 136-140.
- Wattiaux, M. (2001). Mastitis: prevención y detección. Reproducción y selección genética.
- Wedlock, D. N.; Buddle, B. M.; Williamson, J.; Lacy-Hulbert, S. J.; Turner, S. A.; Subharat, S. y Heiser, A. (2014). "Dairy cows produce cytokine and cytotoxic T cell responses following vaccination with an antigenic fraction from *Streptococcus uberis*." *Vet Immunol Immunopathol* **160**(1-2): 51-60.
- Weiss, W. P.; Hogan, J. S.; Smith, K. L. y Hoblet, K. H. (1990). "Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds." *J Dairy Sci* **73**(2): 381-390.
- Wellnitz, O.; Arnold, E. T.; Lehmann, M. y Bruckmaier, R. M. (2013). "Short communication: differential immunoglobulin transfer during mastitis challenge by pathogen-specific components." *J Dairy Sci* **96**(3): 1681-1684.
- Wellnitz, O. y Bruckmaier, R. M. (2012). "The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection." *Vet J* **192**(2): 148-152.
- Wheeler, T. T.; Hodgkinson, A. J.; Prosser, C. G. y Davis, S. R. (2007). "Immune components of colostrum and milk--a historical perspective." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**(4): 237-247.
- Wieliczko, R. J.; Williamson, J. H.; Cursons, R. T.; Lacy-Hulbert, S. J. y Woolford, M. W. (2002). "Molecular typing of *Streptococcus uberis* strains isolated from cases of bovine mastitis." *J Dairy Sci* **85**(9): 2149-2154.

- Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6531-6535.
- Yin, J.; Li, G.; Ren, X. y Herrler, G. (2007). "Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes." *J Biotechnol* **127**(3): 335-347.
- Yuan, Y.; Dego, O. K.; Chen, X.; Abadin, E.; Chan, S.; Jory, L.; Kovacevic, S.; Almeida, R. A. y Oliver, S. P. (2014). "Short communication: Conservation of *Streptococcus uberis* adhesion molecule and the sua gene in strains of *Streptococcus uberis* isolated from geographically diverse areas." *J Dairy Sci*.
- Zachos, T.; Politis, I.; Gorewit, R. C. y Barbano, D. M. (1992). "Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells." *J Dairy Res* **59**(4): 461-467.
- Zadoks, R. N.; Gillespie, B. E.; Barkema, H. W.; Sampimon, O. C.; Oliver, S. P. y Schukken, Y. H. (2003). "Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds." *Epidemiol Infect* **130**(2): 335-349.
- Zadoks, R. N.; Middleton, J. R.; McDougall, S.; Katholm, J. y Schukken, Y. H. (2011). "Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **16**(4): 357-372.
- Zhang, X.; Goncalves, R. y Mosser, D. M. (2008). "The isolation and characterization of murine macrophages." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**: Unit 14 11.
- Zhou, H.; Xiong, Z. Y.; Li, H. P.; Zheng, Y. L. y Jiang, Y. Q. (2006). "An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model." *Vaccine* **24**(22): 4830-4837.
- Zigo, F.; Farkasova, Z.; Elecko, J.; Lapin, M.; Chripkova, M. y Czerski, A. (2014). "Effect of parenteral administration of selenium and vitamin E on health status of

mammary gland and on selected antioxidant indexes in blood of dairy cows." *Pol J Vet Sci* **17**(2): 217-223.