

EFECTO DE LA VARIACION INDIVIDUAL SOBRE
LA PRUEBA DE ADHERENCIA IN VITRO ENTRE
UNA CEPA DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE Y
CELULAS EPITELIALES DEL SENO LACTIFERO
DE GLANDULA MAMARIA BOVINA.

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autonoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por
Claudia Regina Martínez Peniche
Asesor: Gustavo Adolfo García Delgado
México, D.F.
1984.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

R E S U M E N

MARTINEZ PENICHE, CLAUDIA REGINA. Efecto de la variación individual sobre la prueba de adherencia in vitro entre una cepa de Streptococcus agalactiae y células epiteliales del seno lactífero de glándula mamaria bovina (bajo la dirección de: Gustavo Adolfo García Delgado).

Con el fin de detectar variaciones de susceptibilidad a la prueba de adherencia in vitro de una cepa de Streptococcus agalactiae a células epiteliales del conducto de glándula mamaria bovina, se realizó un experimento con vacas de rastro en el que fueron involucradas ciertas técnicas como la recolección de células epiteliales y curvas de crecimiento de bacterias. Se trabajó con 20 muestras de bovinos criollos no lactantes y 10 muestras de bovinos Holstein lactantes, una cepa de Streptococcus agalactiae como bacteria problema y una cepa de E. coli como testigo negativo. Las células y bacterias fueron puestas en contacto y los resultados indican que existe adherencia bacteriana específica a las superficies celulares y que existen variaciones individuales a la prueba de adherencia in vitro.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	ii
INTRODUCCION.....	5
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	17
DISCUSION.....	18
LITERATURA CITADA.....	20
CUADROS Y FIGURAS.....	23

INTRODUCCION

Uno de los problemas más importantes al que debemos enfrentarnos en la actualidad, es el problema de la alimentación. Cada día se plantea más la necesidad de producir alimentos que no requieran de un alto costo, por un lado, y que contengan los requerimientos nutricionales necesarios, por el otro.

En este sentido, la leche de los mamíferos es única, ya que posee todos los elementos necesarios para la nutrición durante los primeros meses de edad (26).

Siendo la producción láctea en México insuficiente, el Médico Veterinario se enfrenta a la importante responsabilidad de hacer posible la producción de leche en mayor cantidad y calidad (26). Una de las maneras de lograr ésto, es reduciendo las infecciones por microorganismos causantes de mastitis.

La mastitis es una de las enfermedades más importantes a las que debe enfrentarse la industria lechera en términos económicos, debido no solo a las pérdidas ocasionadas por la disminución en la producción, sino también a las pérdidas debidas a gastos en medicamentos, diagnóstico de laboratorio y desecho de ganado (13,27).

Por otro lado, el consumo de leche de vacas con mastitis representa un peligro para la salud del hombre (27).

El término mastitis se utiliza para denominar a la inflamación de la glándula mamaria que se caracteriza por cambios químicos, físicos y bacteriológicos de la leche y una baja en la producción de ésta (3,7).

Siendo una enfermedad de distribución mundial, la mastitis es además una enfermedad compleja tanto en etiología como en su duración, presentación y efectos residuales (27).

Debido a la complejidad de su etiología, la mastitis es además una enfermedad de difícil control (27).

La mastitis se inicia comúnmente como el resultado de la penetración de microorganismos al interior de la glándula a través del conducto del pezón. Siendo el medio ambiente favorable para la multiplicación de microorganismos en el interior de la glándula, los productos del metabolismo bacteriano

causarán una irritación en los tejidos y en consecuencia se producirá una respuesta inflamatoria (3). Se sabe ahora además que para que el microorganismo comience el proceso de patogénesis debe adherirse al epitelio de la glándula (8).

Miles en 1955, define la "patogenicidad" como la capacidad de un microorganismo de producir enfermedad. Esta manifestación patogénica varía de acuerdo al estado del huésped; es decir, a mayor resistencia del huésped, la patogenicidad disminuye (20).

Existen factores que operan para prevenir la infección. Estos factores pueden ser de dos tipos: factores inespecíficos, que actúan contra gran cantidad de microorganismos, y factores específicos que basan su respuesta en procesos inmunes contra gérmenes específicos (16).

Dentro de los factores inespecíficos podemos mencionar a la queratina que se localiza en el canal de la teta y que contiene sustancias bacteriostáticas que ayudan a la inhibición de microorganismos (23), las lacteninas que son sustancias antibacterianas de la leche que comprenden complemento, lisozima, peróxidos, peroxidasas y lactoferrinas; estas últimas, proteínas captadoras de hierro que compiten por él con las bacterias (31). Las lactoferrinas aumentan cuando existe inflamación en la glándula (29). Los leucocitos son otro importante mecanismo de defensa de la glándula mamaria ya que son capaces de fagocitar una gran cantidad de microorganismos. Sin embargo, estudios recientes sobre los leucocitos de la glándula mamaria indican que la actividad fagocitaria de éstos se ve reducida en su acción debido a la capacidad que presentan para fagocitar además, glóbulos de grasa y caseína de la leche; que resulta en una disminución de su capacidad para fagocitar microorganismos (24,25).

Aunque de menor importancia, existen ciertos mecanismos físicos que ayudan al organismo en el rechazo de las infecciones por microorganismos. Estos mecanismos son la descamación, el lavado mecánico por la leche y el cierre del esfínter en el canal de la teta (31).

Dentro de los factores específicos contra infecciones podemos mencionar a los anticuerpos que, en la secreción mamaria, se derivan del suero sanguíneo o se producen localmente por células de los linfocitos del plasma sérico. La inmunoglobulina A es producida por las células plasmáticas que se localizan en la submucosa de la glándula, éstas pueden ser estimuladas en su producción gracias a la inmunización local pero sólo producirán una protección limitada induciendo la aglutinación de bacterias. La inmunoglobulina G se secreta durante el calostro y es la mayor inmunoglobulina en calostro y leche. La inflamación aguda de la glándula puede causar su supresión (18).

La inmunoglobulina M es un componente secundario. Se ha estudiado su posible respuesta por la vacunación con varios adyuvantes y por diferentes rutas pero los resultados no son concluyentes (23).

Cuando se habla de profilaxis en el caso de mastitis debe tomarse en cuenta la etiología tan variada de este padecimiento y la pobre respuesta inmunológica que existe en la glándula mamaria (18).

Todos los mecanismos de resistencia antes mencionados se ven reducidos en su acción debido a la comunicación tan directa que se tiene con el exterior a través de la teta y que facilita la penetración de bacterias y otros microorganismos al interior de la glándula (23).

Además de existir factores de resistencia contra infecciones, existen también factores de susceptibilidad. Estos se pueden clasificar de la siguiente manera (3):

Anatómicos. Relacionados con el diámetro, tono muscular, tamaño y localización de la teta.

Genéticos. Relacionados con la resistencia de los ligamentos suspensorios.

Fisiológicos. Relacionados con etapa de lactación, número de lactaciones y edad del animal en producción.

De mamejo. Relacionados con higiene, ordeño y alojamiento inadecuados.

Nutricionales.

Patológicos. Relacionados con lesiones en ubre y pezones.

Existen infinidad de microorganismos causantes de mastitis. Los estudios en México reportan a Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae como los principales microorganismos causantes de mastitis (19).

Streptococcus agalactiae es un coco Gram positivo que tiende a agruparse en cadenas. Algunas de las características más importantes para su diagnóstico son: catalasa⁻, esculina⁻, CAMP⁺, hipurato⁺, sorbitol⁻, manitol⁻, trealosa⁺, rafinosa⁻, salicin⁻, ácido láctico⁺ e inulina⁻ (5). Siendo un Streptococo del grupo B, puede presentar hemólisis de tipo α , β , γ (5) y produce colonias pequeñas, convexas y translúcidas en agar sangre (22).

La mastitis producida por Streptococcus agalactiae es una mastitis subclínica y crónica que ocasionalmente presenta manifestaciones clínicas. Su diseminación es gradual a otros cuartos o a otras vacas. Existe inflamación y destrucción de alveolos y reemplazo del parénquima por tejido conectivo (27).

La respuesta de la glándula mamaria a la infección se traduce en una inflamación que puede ocurrir en cualquiera de las formas exudativas excepto la catarral (27).

Cuando la inflamación es crónica, como en el caso de la mastitis producida por Streptococcus agalactiae, habrá una proliferación de tejido fibroso en cualquiera de los sitios de la glándula (13). Después de la penetración del microorganismo, habrá una multiplicación rápida de éste en los conductos galactóforos seguida del paso de la bacteria a los vasos linfáticos supramamarios con la aparición de gran cantidad de neutrófilos en los conductos glandulares y se harán manifiestos los signos del proceso inflamatorio clásico (13).

En lo sucesivo ocurren crisis análogas que afectan los lobulillos de la misma manera dando lugar así a pérdida gradual de la función secretoria con fibrosis creciente del

cuarto glandular y atrofia final (13).

Adherencia bacteriana.

Las bacterias tienen la capacidad de adherirse a su superficies de distinta naturaleza como son: arena, tierra, vidrio, hifas de hongos, intestinos de nemátodos, superficies de protozoarios, tejidos animales y vegetales, y aún hasta a la superficie de otras bacterias formando agregaciones bacterianas (2).

A pesar de que muchos años se han realizado estudios intensos en este campo, hasta recientemente se le ha dado importancia al concepto de adherencia bacteriana como una ventaja ecológica de gran importancia en la colonización de sitios específicos en las plantas y en lso animales. De ahí, que se le considere como el evento inicial en la patogénesis de una gran cantidad de infecciones bacterianas en los animales y el hombre (2).

La posible participación de la adherencia bacteriana en la patología de algunas enfermedades humanas, ha sido estudiada ampliamente en el desarrollo de la caries dental (12), de las infecciones del tracto urinario (17), las infecciones del tracto digestivo (15), las infecciones vaginales (30), y otras. Pero aún es necesario realizar más estudios que nos conduzcan al entendimiento de los procesos involucrados.

El estudio de la adherencia bacteriana nos da algunas bases importantes para el entendimiento de la resistencia innata o la susceptibilidad del huésped y de los tejidos a ciertas infecciones; ya que las bacterias potencialmente patógenas no colonizan ni causan daño indiscriminadamente a todos los huéspedes con los que pudiera estar en contacto, sino que atacan particularmente a ciertas especies animales o a un grupo de especies relacionadas (12).

Gibbons (1975) señala que existe una preferencia a parente de deferentes especies de Streptococcus a diferentes superficies celulares y aparentemente a receptores específicos; así, Streptococcus mutans suele adherirse y colonizar en la superficie de los esmaltes de los dientes de los animales y del hombre (12).

la placa dental mientras que Streptococcus salivarius coloniza predominantemente las células superficiales de la lengua y de la mucosa bucal, por otro lado, Streptococcus pyogenes tiene afinidad por células epiteliales de la faringe (12). Estos ejemplos se refieren a mecanismos que ocurren en el hombre, en animales esto está por investigarse más aún.

A pesar de los mecanismos de defensa que existen en los organismos, existen microorganismos patógenos capaces de producir enfermedad y cuya habilidad puede ser atribuida a los siguientes procesos:

La capacidad de penetrar al huésped por diferentes vías.

La capacidad de multiplicarse en los tejidos; esto implica una interacción entre las células epiteliales del huésped y las bacterias involucradas. Se ha observado que ciertas infecciones no se establecen mientras no exista interacción célula-bacteria. Esto conduce a considerar a la adherencia bacteriana como el evento inicial más importante en el desarrollo de ciertas infecciones.

La capacidad de resistir las defensas del huésped.

La capacidad de dañar al huésped mediante la producción de toxinas (28).

La capacidad de los microorganismos de asociarse físicamente a las células, se atribuye a la presencia de estructuras superficiales que interaccionan con los componentes de la superficie celular del huésped. Estas estructuras superficiales son denominadas adhesinas y se refieren a cualquier estructura involucrada en la adherencia bacteriana (12).

Entre las estructuras bacterianas que median la unión con la célula se encuentran las siguientes: fimbrias o pili en organismos Gram⁻ como E. coli y Neisseria gonorrhoeae, fibrillas en organismos Gram⁺ como Streptococcus pyogenes, proteínas de membrana externa como en Neisseria gonorrhoeae, antígenos de superficie como K 88 y K 99 de E. coli, cápsula como en Actinomyces viscosus, glicocalix de Pseudomonas aeruginosa y recientemente se ha descrito la participación de antígenos

flagelares de Vibrio cholerae en la adherencia de este microorganismo a la mucosa intestinal (2).

El estudio de la superficie celular eucariótica es considerado de gran importancia, ya que posee los sitios receptores complementarios para que la adherencia se lleve a cabo. La especificidad de la unión dependerá de la naturaleza y composición química de los receptores y los ligandos.

Las superficies celulares del huésped poseen una gran cantidad de componentes cuyas funciones, en muchos casos no se conocen. Sin embargo, actualmente se reconocen entre estos componentes a los antígenos de grupos sanguíneos, a los antígenos de histocompatibilidad, estructuras que reconocen a otras células y estructuras relacionadas con la adherencia (11).

Para el estudio de la interacción entre las células del huésped y las bacterias en el proceso infeccioso, los carbohidratos de la membrana son quizá los componentes más importantes por la variabilidad estructural que presentan; lo que determina la especificidad de la unión entre los receptores celulares y los ligandos bacterianos en el inicio de la infección.

En un principio, se pensó que la membrana plasmática constituía la estructura más externa de las células animales. Sin embargo se ha demostrado mediante estudios de microscopía electrónica, que las células animales están circundadas por un matrix fibroso constituido por polímeros aniónicos de naturaleza polisacárida que se conocen como el glicocálix. Posteriormente, Costerton y col. (1978) han recalcado la importancia del glicocálix en el fenómeno de adherencia bacteriana como una condición ecológica favorable para que los microorganismos patógenos puedan colonizar las mucosas del huésped y posteriormente iniciar la infección (6).

La presencia de estos azúcares sobre la superficie celular, coloca a la célula en una posición clave para funcionar en el fenómeno de la adherencia como receptor de ligandos bacterianos.

A pesar de que se han realizado estudios en relación

a la adherencia bacteriana a las superficies celulares del huésped, es recientemente cuando se comienza a trabajar en adherencia bacteriana en glándula mamaria.

Frost en 1975, realiza estudios preliminares que muestran la capacidad de ciertos patógenos de la glándula mamaria para adherirse a las células epiteliales del conducto de la misma. Frost determina que la adherencia de Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae fue significativa mientras que el índice de adherencia en bacterias como E. coli, Streptococcus fecalis y Corynebacterium bovis fue poco significativo (8).

Siendo Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus los microorganismos más frecuentemente aislados en infecciones de la glándula mamaria, se reconoce ahora que su capacidad para adherirse a las células epiteliales es un importante paso en la patogénesis de la mastitis bovina (8,9).

Posteriormente, Frost y col. (1977), encontraron que la adherencia se incrementaba desde los senos de la teta a los senos lactíferos y grandes ductos y demostraron que no existía diferencia en cuanto a adherencia a las células de diferentes cuartos de la misma vaca pero existía una diferencia significativa entre vacas (cuadro 1). Estos autores comprobaron además que la adherencia generalmente prevalece paralela como causa de enfermedad con Streptococcus agalactiae y Staphylococcus aureus adhiriéndose mejor (10).

En 1978 Harper y col. realizaron experimentos de adherencia con cepas de E. coli con antígeno K 88 y K 99 observando que no existía adherencia de este microorganismo a las células epiteliales de glándula mamaria bovina a pesar de que cierta adherencia había sido determinada previamente en otros tejidos (14).

Anderson en 1978, demostró que bacterias como Staphylococcus aureus, Streptococcus epidermidis y E. coli no se adhieren al epitelio alveolar de ratones lactantes y no lactantes realizando experimentos in vivo, lo que podría ser un estudio preliminar para comprobar que la adherencia de microorga

nismos causantes de mastitis sólo se lleva a cabo en ciertas especies (1).

Wanasinghe en 1981 realiza los primeros trabajos destinados a determinar el mecanismo por el cual la adherencia en glándula mamaria bovina se lleva a cabo. Wanasinghe trabajó con una cepa de Staphylococcus aureus observando los efectos de factores físicos, químicos, enzimáticos y biológicos sobre la prueba de adherencia in vitro. Sus resultados determinan que la adherencia no fué afectada por el pretratamiento de la bacteria con NaCl o EDTA, ni con un p^H de 6-8, pero fué inhibida por calor ($60^{\circ}C$ por 30 min) y pretratamientos bacterianos con tripsina y papaína, los pretratamientos con lipasa de germen de trigo incrementaron la adherencia. La adherencia fué también inhibida con leche de un cuarto infectado con Staphylococcus aureus y con un antisuero específico antiestafilocócico. Todo esto sugiere que la adherencia estafilococcica a la glándula mamaria puede ser de naturaleza proteica (33)(cuadro 2).

Bramley y Hogben en 1982 trabajaron también con pretratamientos bacterianos para tratar de encontrar las causas por las que el proceso de adherencia bacteriana se lleva a cabo con varias cepas de Streptococcus agalactiae de diferentes orígenes (4).

Aunque algunos aspectos sobre adherencia bacteriana en glándula mamaria han sido tratados, no se han realizado trabajos relacionados con la susceptibilidad entre individuos a la prueba de adherencia in vitro con otro tipo de bacterias como Streptococcus agalactiae a pesar de su importancia y los trabajos sobre pretratamientos bacterianos no son concluyentes.

El presente trabajo tiene como finalidad detectar las variaciones de susceptibilidad entre individuos a la prueba de adherencia in vitro con una cepa de Streptococcus agalactiae utilizando células epiteliales de los senos lactíferos y senos de la teta de glándulas mamarias bovinas.

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Bacteriología de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Las células utilizadas fueron obtenidas de bovinos criollos y Holstein del Rastro de Ferrerría, D.F. Se utilizaron 30 muestras y 5 testigos.

Se trabajó con una cepa de Streptococcus agalactiae (B 83-039) aislada de una mastitis bovina en el Departamento de Bacteriología.

Como testigo negativo fue empleada una cepa de E. coli (B 83-132) aislada en el Departamento de Bacteriología.

El material y métodos empleados fué el resultado de una recopilación de las técnicas descritas (4,8,10,33,34) y de un estudio piloto previo que se realizó en el Departamento de Bacteriología, con el fin de optimizar la técnica.

Células

Se obtuvieron glándulas mamarias de diferentes individuos aparentemente normales recién sacrificados y se transportaron en refrigeración.

Los conductos de las glándulas fueron cortados antes de 4h con el fin de exponer los senos lactíferos y seno de la teta. El exceso de leche en los senos fué removido con 50 ml de solución fosfato buferada (SFB) 0.01M, p^H 7.4-7.7.

Posteriormente, el conducto de la glándula fué cepillado enérgicamente 8 veces con un cepillo dental suave para la obtención de las células epiteliales de los senos lactíferos y senos de la teta. Las células fueron suspendidas en 10 ml de SFB y lavadas por centrifugación a 551. X g durante 10' 3 veces.

Las células, después de ser lavadas, fueron resuspendidas en un ml de SFB a una concentración de 10² células/ml. La concentración de las células fué determinada en una cámara cuenta glóbulos de Neubauer.

Microorganismos

Se preparó un cultivo fresco de una cepa de Strepto

coccus agalactiae después de haber sido desliofilizado y creció en caldo tripticasa soya por 24h a 37°C. Posteriormente, 0.1 ml de este caldo fué puesto en 100 ml de caldo tripticasa soya a 37° C y en agitación. Cada media hora fueron extraídos 3 ml de este caldo y medidos en un espectrofotómetro para determinar su fase de crecimiento tomando en cuenta la absorbancia que cada muestra reportó. Para obtener la fase de crecimiento o fase logarítmica de la bacteria, se realizó lo anterior 3 veces y se obtuvo un promedio.

Posteriormente, se tomó un valor a la mitad de la fase de crecimiento de la bacteria y se realizaron diluciones y 4 gotas de 20 mcl cada una, fueron puestas en gelosa sangre e incubadas a 37°C durante 24 h.

Las colonias que crecieron en cada dilución fueron contadas para determinar el número de u.f.c. en diferente dilución. Como existieron diluciones en las que el número de colonias era incontable o no existían colonias, se tomó como número aquel en el que las colonias eran fácilmente contables.

En el caso de Streptococcus agalactiae el número de u.f.c. fué de 17 en la dilución 10^{-4} . Ajustando esto a 1 ml se obtuvieron 500,000 u.f.c.

En el caso de E. coli, se siguió el mismo proceso obteniéndose 14 colonias en la dilución 10^{-5} lo que determinó 70, 000,000 de u.f.c./ml.

Ambas bacterias fueron ajustadas para tener 10^4 u.f.c./ml.

Células-microorganismos.

1 ml de la suspensión de células fué mezclado con 1.14 mcl de la suspensión de Streptococcus agalactiae y en el caso de E. coli, 1.66 mcl; esta mezcla fué centrifugada a 100 r.p.m. durante 30' a 37°C con el fin de facilitar la adherencia bacteriana a las células.

20 mcl de la mezcla célula-bacteria fueron puestos en porta objetos. secadas al aire y fijadas por medio de un ligero calentamiento.

Las laminillas conteniendo Streptococcus agalactiae

fueron teñidas con cristal violeta por 30'' y observadas al mi
croscópio con aceite de inmersión. En el caso de E. coli, la
tinción empleada fué la de Gram.

La cuenta se hizo obteniendo un índice de acuerdo al
número de bacterias adheridas a 50 células.

En agrupaciones bacterianas sólo se contaron las bac
terias de esas agrupaciones que estaban adheridas a las célu
las.

Los resultados fueron analizados mediante una prueba
de t.

RESULTADOS

La adherencia de Streptococcus agalactiae a las células epiteliales de la glándula mamaria bovina in vitro fué comprobada (figura 1).

Los resultados se ilustran en los cuadros 3, 4 y 5.

En las preparaciones conteniendo el testigo negativo E. coli sólo se apreció una adherencia ocasional de la bacteria a la célula.

En algunas preparaciones las células fueron detectadas en grupos, lo que dificultó la cuenta, por lo que se decidió contar exclusivamente las bacterias adheridas a células solas.

En otras no se encontró un número suficiente de células para ser contadas aparentemente debido al tipo de muestra que no provenía de vacas lactantes, por lo que fueron contadas las células detectadas en el campo obteniéndose un promedio.

En las preparaciones en las que se logró utilizar vacas lactantes, se aprecia una diferencia significativa en cuanto al número de células epiteliales presentes y al número de bacterias adheridas a estas células en relación a las no lactantes.

DISCUSION

Con base en los resultados obtenidos en relación a la adherencia de Streptococcus agalactiae, existe evidencia de que ésta se lleva a cabo como fué propuesto por Frost (8), y parece que esta adherencia puede ser un paso importante en la patogénesis de la mastitis bovina aunque aún deben realizarse más investigaciones al respecto.

Estos estudios sugieren además que la infección en los cuartos afectados por mastitis debida a Streptococcus agalactiae, tiene su origen vía el canal de la teta y el tejido ductular de la glándula mamaria bovina como lo menciona Frost (8).

Aparentemente, el epitelio ductal experimenta ciertos cambios debidos a la actividad secretora de la glándula por lo que es probable que exista mayor adherencia en las células epiteliales de glándula mamaria de ganado lactante (8). En relación a esto, se observa que en el caso de ganado lactante, no sólo se aprecia una mayor adherencia, sino que se observa un mayor número de células epiteliales presentes. En este sentido, es necesario realizar más estudios relacionados con estos mecanismos ya que la comparación entre vacas lactantes y no lactantes a la prueba de adherencia in vitro no se había reportado hasta ahora.

Por otro lado, se observa que aunque algunas bacterias permanecen en contacto estrecho con las células, otras no parecen ofrecer atracción alguna a estas células. Esto parece deberse a cierto grado de especificidad que presentan algunas células a las que los microorganismos se adhieren como lo sugieren Frost y col. (10).

Las diferencias individuales observadas en la prueba de adherencia in vitro con una cepa de Streptococcus agalactiae en los animales criollos, parece ser poco significativa ($t = .975 \quad 1.54^{\dagger}.00036$) mientras que las observadas en los individuos Holstein en relación a los individuos criollos fué mayor ($t = .95 \quad .32^{\dagger}.001$). Esto confirma el estudio de Frost en relación a las diferencias individuales entre 5 vacas aunque

con Staphylococcus aureus (8).

Las diferencias detectadas entre razas no habían sido reportadas.

Por otro lado, la adherencia de E. coli, utilizada como testigo negativo, al epitelio de la glándula mamaria bovina, parece ser poco significativa lo que confirma la hipótesis planteada por Frost en el sentido de la excasa capacidad de adherirse a las células epiteliales del conducto de glándula mamaria bovina in vitro (8). Es posible que utilizando una cepa de E. coli aislada de mastitis bovina, ésta muestre una mayor adherencia a las células epiteliales de glándula mamaria bovina in vitro pero esto debe investigarse más aún.

La hipótesis y objetivos planteados en este trabajo en relación a las diferencias individuales a la prueba de adherencia in vitro con una cepa de Streptococcus agalactiae y células epiteliales del conducto de glándula mamaria bovina, fueron comprobadas aunque estas diferencias individuales sean estadísticamente poco significativas.

LITERATURA CITADA

- 1.- Anderson, J.C. : Absence of bacterial adherence in the establishment of experimental mastitis in mice. Vet. Pathol., 15: 770-775 (1978).
- 2.- Beachey, E.H. : Bacterial adherence: adhering receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis., 143: 325-345 (1981).
- 3.- Blood, D.C. y Henderson, J.A. : Medicina veterinaria. 5ª ed. Interamericana, México, D.F. 1982.
- 4.- Bramley, A.J. and Hogben, E.M. : The adhesion of human and bovine isolates of Streptococcus agalactiae (group B) to bovine mammary gland epithelial cells. J. Comp. Pathol., 92: 131-137 (1982).
- 5.- Carter, G.R. : Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 3 th ed. Charles C. Thomas, Springfield, 1979.
- 6.- Costerton, J. W., Irvin, R.T. and Cheng, K. J. : The role of bacterial surface structures in pathogenesis. Rev. Microbiol., 8 : 303-338 (1981).
- 7.-Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B. and Mc. Carty, M. : Microbiology. 2 nd ed. Harper & Row, New York, 1973.
- 8.- Frost, A.J. : Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the mammary gland. Infect. Immun., 13 : 1154-1156 (1975).
- 9.- Frost, A.J. : Bacterial adherence and bovine mastitis. Vict. Vet. Proc., 35 : 7-10 (1977).
- 10.-Frost, A.J., Wanasinghe, D.D. and Woolcock, J.B. : Some factors affecting selective adherence of microorganisms in bovine mammary gland. Infect Immun., 15 : 245-253 (1977).
- 11.-Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. y Wells, J. V. : Inmunología clínica. 3ª ed. El manual moderno, México, D.F, 1978.
- 12.-Gibbons, R.J. : Attachment of oral Streptococci to mucosal surfaces, In: Schlessinger, D. (ed) Microbiology. American

- Society of Microbiology, Washington, D. C., 1975.
- 13.-Gillespie, J.H. and Timoney, J.F. Infectious diseases of domestic animals. 7 th ed. Cornell University Press, Ithaca, 1981.
 - 14.-Harper, M., Turvey, A. and Bramley, A.J. : Adhesion of fimbriate E. coli to bovine mammary gland epithelial cells in vitro. J. Med. Microbiol., 11 : 117-123 (1978).
 - 15.-Isaacson, R.E., Fusco, P.C., Brinton, C.C. and Moon, H. W. : In vitro adhesion of E. coli to porcine small intestinal epithelial cells: pili as adhesive factors. Infect. Immun., 21 : 392-397 (1978).
 - 16.-Jawetz, E., Melvick, J.L. y Adelberg, E.A. : Manual de microbiología médica. 7ª ed. El manual moderno, México, D. F., 1977.
 - 17.-Källenius, G.R., Möllby. and Winsberg, J. : In vitro adhesion of uropathogenic E. coli to human periurethral cells. Infect. Immun., 28 : 295-299 (1979).
 - 18.-Lascelles, A.K. : The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. J. Dairy Sci., 62 : 154-160 (1979).
 - 19.-Madariaga, A.O.E. y López, A.J. : Bacterias asociadas con la mastitis bovina en México y su susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos. Vet. Mex., 10 : 213-219 (1979).
 - 20.-Miles, A.A. : The meaning of pathogenicity. 5 th Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, London, 1955.
 - 21.-Mims, C.A. : The pathogenesis of infectious disease. Academic Press, London, 1976.
 - 22.-National Mastitis Council, Inc. : Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis. University of New Hampshire Press, 1969.
 - 23.-Natzke, R.P. : Elements of mastitis control. J. Dairy Sci., 64 : 1431-1442 (1981).
 - 24.-Paape, M.J. and Wering, W.P. : The leukocytes as a defense mechanism. J. Am. vet. Med. Ass., 170 : 1214-1223 (1977).

- 25.-Paape, M.J. et al. Leukocytes second line of defense against invading mastitis pathogens. J. Dairy Sci., 62 : 135-153 (1979).
- 26.-Ruiz, S.H. : Memorias del curso sobre mastitis bovina. Universidad Nacional Autónoma de México., 1-2 junio-julio 1982.
- 27.-Schalm, O.W., Carroll, E.J. and Jain, N.C. : Bovine mastitis. Lea and Febeger, Philadelphia, 1971.
- 28.-Smith, H. : Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Rev. Bacteriol., 41 : 475-500 (1977).
- 29.-Smith, K.L. and Schawbacher, E.L. : Lactoferrin as a factor of resistance to infection of bovine mammary gland. J. Am. vet. Med. Ass., 170 : 1224-1227 (1977).
- 30.-Swanson, J. : Role of pili in interactions between Neisseria gonorrhoeae and eukariotic cells in vitro. Schlessinger, D. (ed) Microbiology American Society of Microbiology, Washington, D. C, 1975.
- 31.-Tizard, I.R. : Inmunología veterinaria. Interamericana, México, 1979.
- 32.-Wanasinghe, D.D. : Role of bacterial adherence in the pathogenesis of bovine mastitis (abstracts). Ceylon Vet. J., 26 : 55-56 (1978).
- 33.-Wanasinghe, D.D. : In vitro adherence of Staphylococcus aureus to bovine mammary gland epithelial cells. Acta Vet. Scand., 22 : 99-108 (1981).
- 34.-Wanasinghe, D.D. : Adherence as a prerequisite for infection of the mammary gland by bacteria. Acta Vet. Scand., 22 : 109-117 (1981).

CUADRO 1

ADHERENCIA RELATIVA A CELULAS DERIVADAS
 DEL EPITELIO DE LOS SENOS DE LA TETA,
 SENOS LACTIFEROS Y GRANDES DUCTOS

ORIGEN	NUMERO DE CELULAS QUE MOSTRARON ADHE RENCIA (100)	NUMERO DE BACTERIAS ADHERIDAS	PROMEDIO DE BACTE RIAS POR CELULA
SENOS DE LA TETA	56	193	3.3
SENOS LACTIFEROS	64	237	4.2
GRANDES DUCTOS	70	467	6.5

CUADRO 2

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO BACTERIANO CON AGENTES
 FISICOS, QUIMICOS, BIOLOGICOS Y ENZIMATICOS
 SOBRE LA ADHERENCIA A LAS CELULAS
 EPITELIALES DE LA GLANDULA MAMARIA
 BOVINA IN VITRO

PARAMETRO	NUMERO DE CELULAS CON BACTERIAS ADHE RIDAS (100)	NUMERO DE BACTE RIAS ADHERIDAS A 100 CELULAS
EDAD DEL CULTIVO:		
4 h	45	114
6 h	41	111
10 h	31	68
24 h	27	72
72 h	26	57
pH:		
6.0	58	146
7.4	59	170
8.0	67	146
<hr/>		
INDICE DE ADHERENCIA/100		
CALOR:		
37°C		100
60°C por 30'		36
100°C por 30'		38
121°C por 15'		18
ENZIMAS PROTEOLITICAS:		
Tripsina		11
Papaína		13
ENZIMAS LIPOLITICAS:		
Lipasa de germen de trigo 4 mg/ml		231
LECHE:		
De un cuarto no infectado		83
De un cuarto infectado		56

CUADRO 3

ADHERENCIA RELATIVA DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE
 B83-039 A CELULAS EPITELIALES DE GLANDULA
 MAMARIA DE BOVINOS CRIOLLOS NO LACTANTES

INDIVIDUO	NUMERO DE ORGANISMOS ADHERIDOS A CELULAS (50)	PROMEDIO DE ORGANISMOS ADHERIDOS A 50 CELULAS
1	70	1.40
2	70	1.40
3	73	1.46
4	73	1.46
5	75	1.50
6	75	1.50
7	75	1.50
8	76	1.52
9	77	1.54
10	77	1.54
11	78	1.56
12	78	1.56
13	78	1.56
14	79	1.58
15	80	1.60
16	80	1.60
17	80	1.60
18	80	1.60
19	84	1.68
20	84	1.68

$$\bar{x} = 1.54$$

$$s = .077$$

CUADRO 4

ADHERENCIA RELATIVA DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE
 B83-039 A CELULAS EPITELIALES DE GLANDULA
 MAMARIA DE BOVINOS HOLSTEIN LACTANTES

INDIVIDUO	NUMERO DE ORGANISMOS ADHERIDOS A CELULAS (50)	PROMEDIO DE ORGANISMOS ADHERIDOS A 50 CELULAS
-----------	---	--

1	90	1.80
2	91	1.82
3	92	1.84
4	92	1.84
5	93	1.86
6	93	1.86
7	95	1.90
8	95	1.90
9	96	1.92
10	97	1.94

$\bar{x} = 1.86$
 $s = .046$

BOVINOS HOLSTEIN - CRIOLLOS
 DISTRIBUCION t
 VALOR MODIFICADO DE LOS GRADOS DE LIBERTAD 1
 COEFICIENTE DE COMFIANZA t .95 .32 ± .0011055

CUADRO 5

ADHERENCIA RELATIVA DE E. COLI B83-132
 A CELULAS EPITELIALES DE GLANDULA
 MAMARIA DE BOVINOS CRIOLLOS

INDIVIDUO	NUMERO DE ORGANISMOS ADHERIDOS A CELULAS (50)	PROMEDIO DE ORGANISMOS ADHERIDOS A 50 CELULAS
-----------	---	--

1	15	.30
2	18	.36
3	20	.40
4	21	.42
5	23	.46

-
 $x = .38$
 $s = .1760$

FIGURA 1

Fig. 1. Streptococcus agalactiae adhi
riéndose a las células epiteliales de
la glandula mamaria. Cristal violeta
100 x